

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Química-Física Aplicada**



**ESTUDIO DE LA FRACCIÓN PROTEICA DE  
LECHE Y FÓRMULAS INFANTILES  
SOMETIDAS A ALTAS PRESIONES**

**Fca Isabel Bravo Vázquez**

**Tesis doctoral**

**Junio 2012**

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA  
ALIMENTACIÓN**

**CIAL**



**CSIC**  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Química-Física Aplicada**



**ESTUDIO DE LA FRACCIÓN PROTEICA DE  
LECHE Y FÓRMULAS INFANTILES  
SOMETIDAS A ALTAS PRESIONES**

Memoria presentada por

**FCA ISABEL BRAVO VÁZQUEZ**

Para optar al grado de

**Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos**

Directoras:

Dras. Rosina López-Alonso Fandiño y Elena Molina Hernández

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Universidad Autónoma de Madrid

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación

**ROSINA LÓPEZ-ALONSO FANDIÑO, PROFESORA DE INVESTIGACIÓN y ELENA MOLINA HERNÁNDEZ, CIENTÍFICA TITULAR, CON DESTINO EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN**

**INFORMAN:**

Que el presente trabajo titulado “Estudio de la fracción proteica de leche y fórmulas infantiles sometidas a altas presiones” y que constituye la Memoria que presenta Francisca Isabel Bravo Vázquez para optar al grado de Doctora, se ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Bioactividad y Análisis de Alimentos del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, CSIC-UAM).

Y para que conste firmamos el presente informe a 8 de junio de 2012.

Fdo.: Rosina López-Alonso Fandiño

Fdo.: Elena Molina Hernández

VºBº Tutora:

Fdo.: Fco. Javier Señoráns

## AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral ha sido desarrollada en el Departamento de Caracterización de Alimentos del Instituto de Fermentaciones Industriales (IFI, CSIC) y en el Departamento de Bioactividad y Análisis de Alimentos del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, CSIC-UAM). Durante la realización de la misma he disfrutado de un contrato de Técnico de Apoyo a la Investigación financiado por la Comunidad de Madrid.

Este trabajo ha sido realizado bajo la dirección de las Dras. Rosina López-Alonso Fandiño y Elena Molina Hernández, a las cuales quiero agradecer la posibilidad que me han brindado de iniciarme en la investigación, trabajar en sus grupos, sus enseñanzas y orientaciones.

Mi agradecimiento y gratitud al Instituto de Fermentaciones Industriales y al Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, a las directoras de los mismos, las Dras. Lourdes Amigo y M<sup>a</sup> Victoria Moreno respectivamente, y a los equipos directivos por poner a mi disposición los medios técnicos y académicos necesarios para la realización de este trabajo. Mi agradecimiento al Dr. F<sup>co</sup> Javier Señoráns por aceptar la tutoría de esta tesis y a las Dras. Mercedes Ramos, M<sup>a</sup> Victoria Moreno y Nieves Corzo, jefas del Departamento de Caracterización de Alimentos del IFI y de Bioactividad y Análisis del CIAL durante este periodo, por su aceptación y apoyo para trabajar en su departamento.

El trabajo desarrollado ha contado con la ayuda y el suministro de muestras de Laboratorio Ordesa S.A. También ha sido inestimable la colaboración de Xavier Felipe (y colaboradores) del IRTA.

Quiero agradecer a las Dras. Isidra Recio, Lourdes Amigo, Josefina Belloque, Encarnación Pueyo y a los Dres. Adolfo Martínez e Iván López su apoyo y sus consejos. Y a Constanza por su constante amistad.

Agradecer de manera especial a mis compañeros de laboratorio su amistad, sus consejos y por el buen ambiente del laboratorio.

Este trabajo se lo dedico a mis padres, mi hermana y Juanma por haberme ayudado a estar aquí, a seguir adelante y darme cariño aunque sea por teléfono.

## **ÍNDICE**



## RESUMEN

## LISTA DE ABREVIATURAS

### 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Las proteínas de la leche de vaca.....	3
1.1.1. Las proteínas de suero.....	3
1.1.2. Las caseínas.....	6
1.1.3. La micela de caseína.....	8
1.1.3.1. Factores que afectan a la micela de caseína.....	10
1.2. Nuevas técnicas de procesamiento de alimentos.....	11
1.2.1. Tratamientos con altas presiones.....	12
1.2.1.1. Fundamentos de los tratamientos con alta presión.....	13
1.2.1.2. Equipos de alta presión.....	14
1.2.1.2.1. Tipos de equipos de alta presión.....	16
1.2.1.3. Efecto de la alta presión sobre las proteínas.....	19
1.2.1.3.1. Efecto de la alta presión sobre las proteínas del suero.....	19
1.2.1.3.2. Efecto de la alta presión sobre las micelas de caseína.....	23
1.2.1.4. Aplicaciones tecnológicas de los tratamientos con alta presión.....	28

### 2. OBJETIVO GENERAL Y PLAN DE TRABAJO.....35

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Preparación de las muestras y tratamiento aplicado.....	43
3.2. Obtención de fracciones proteicas.....	43
3.3. Análisis de las muestras control y de las fracciones proteicas.....	44
3.3.1. Determinación del contenido en nitrógeno.....	44
3.3.2. PAGE-SDS.....	44
3.3.3. Electroforesis capilar.....	45
3.3.4. ELISA tipo sándwich.....	46
3.3.5. Medida del tamaño de la micela de caseína.....	47
3.3.6. Determinación del contenido en lactosa y lactulosa.....	48
3.3.7. Determinación del contenido en furosina.....	49
3.4. Análisis estadístico.....	50

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<u>Capítulo I</u> .....	53
I.1. Introducción.....	55
I.2. Materiales y Métodos.....	56

I.2.1. Preparación de las muestras y tratamientos aplicados.....	56
I.3. Resultados.....	56
I.3.1. Efecto de los tratamientos UHT y con alta presión en las proteínas mayoritarias de la leche.....	58
I.3.2. Efecto de los tratamientos UHT y con alta presión en las proteínas minoritarias del suero.....	63
I.3.3. Efecto del tratamiento UHT y de presión en el avance de la reacción de Maillard y la isomerización de la lactosa.....	65
I.4. Discusión.....	66
I.5. Conclusiones.....	68
<u>Capítulo II.....</u>	71
II.1. Introducción.....	73
II.2. Materiales y Métodos.....	74
II.2.1. Preparación de las muestras.....	74
II.2.2. Tratamientos de alta presión.....	75
II.3. Resultados.....	77
II.3.1. Caseínas no sedimentables y proteínas de suero presentes en la fracción soluble de leche desnatada tratada con altas presiones.....	77
II.3.2. Desnaturalización de las proteínas del suero en leche desnatada tratada por altas presiones.....	82
II.3.3. Proteínas de suero desnaturalizadas y no sedimentables en suero de ultracentrifugación tratado con altas presiones.....	86
II.4. Discusión.....	88
II.4.1. Efecto del tipo de equipo de alta presión y de la velocidad de despresurización en la liberación de caseínas no sedimentables a la fase soluble de la leche.....	88
II.4.2. Influencia de la desnaturalización de las proteínas de suero.....	91
II.5. Conclusiones.....	92
<u>Capítulo III.....</u>	93
III.1. Introducción.....	95
III.2. Materiales y Métodos.....	96
III.2.1. Preparación de las muestras.....	96
III.2.2. Tratamientos de alta presión.....	97



III.3. Resultados.....	99
III.3.1. Solubilización de caseínas y desnaturalización de proteínas del suero en leche desnatada tratada por altas presiones.....	99
III.3.2. Solubilización de caseínas y desnaturalización de proteínas del suero en leche presurizada en presencia de agentes bloqueantes de grupos sulfhidrilo.....	108
III.4. Discusión.....	109
III.5. Conclusiones.....	111
<u>Capítulo IV.....</u>	113
IV.1. Introducción.....	115
IV.2. Materiales y Métodos.....	116
IV.2.1. Preparación de las muestras.....	117
IV.2.2. Tratamientos de presurización.....	117
IV.2.3. Fraccionamiento y análisis.....	117
IV.3. Resultados.....	119
IV.3.1. Efecto de la presión en el tamaño de la micela de caseína.....	119
IV.3.2. Efecto de la presión en la distribución proteica.....	121
IV.4. Discusión.....	130
IV.5. Conclusiones.....	134
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>135</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>139</b>

## Resumen

En la actualidad, la industria alimentaria utiliza proteínas lácteas como ingredientes en productos alimentarios, por su valor nutricional y, sobre todo, por sus propiedades funcionales. Entre otros muchos productos, estas proteínas son utilizadas para la elaboración de fórmulas infantiles. Aunque el mejor alimento para el recién nacido es la leche materna, no siempre es posible la lactancia y es necesario recurrir a fórmulas infantiles que sustituyan a la leche humana. Según el Codex Alimentarius, las fórmulas infantiles deben promover el normal crecimiento y desarrollo del niño y satisfacer, por sí solas, sus requerimientos nutricionales. Sin embargo, también se persigue que, en la medida de lo posible, reproduzcan las propiedades beneficiosas que caracterizan a la leche humana, muchas de las cuales, se deben a la fracción proteica. Así, una ingesta adecuada de proteínas durante los primeros meses de vida, tanto en lo que respecta a su contenido como a una elevada relación entre proteínas de suero y caseínas, evita la ganancia excesivamente rápida de peso, facilita el proceso de digestión y favorece una mayor colonización del intestino por bacterias probióticas.

En los últimos años el procesado con altas presiones hidrostáticas ha conseguido un gran desarrollo comercial, ya que permite obtener productos con características similares a los alimentos frescos, pero con una mayor vida útil. Además, las altas presiones también modifican la estructura de las proteínas, conduciendo a propiedades funcionales únicas o muy difíciles de conseguir mediante otros procesos. Estos cambios dependen de factores tales como el nivel de presión, la duración del tratamiento, la temperatura, el pH, etc. Actualmente, el efecto de la mayoría de estas variables se conoce bien, pero rara vez se ha estudiado la influencia de parámetros como el tipo de equipo de alta presión, la velocidad de despresurización o el empleo de presiones muy elevadas, superiores a 600 MPa.

Esta tesis doctoral profundiza en la desnaturalización de las proteínas lácteas y en los cambios en la distribución de proteínas que origina el tratamiento con altas presiones hidrostáticas. El objetivo era explorar el potencial de las altas presiones para mantener la calidad nutritiva de las proteínas de la leche y obtener fracciones lácteas de

diferente composición y concentración de proteínas, con aplicabilidad en la elaboración de nuevas formulas infantiles.

Para desarrollar este estudio se obtuvieron diferentes fracciones lácteas a partir de leche sometida a presiones comprendidas entre 250 y 900 MPa, en equipos a escalas piloto e industrial, con diferentes tiempos de presurización y despresurización, y se estudió su composición proteica mediante Kjeldahl, electroforesis capilar, SDS-PAGE y ELISA, principalmente. Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto que la distribución de caseínas y seroproteínas en las fracciones estudiadas depende del equipo utilizado, el nivel de presión y el tiempo de mantenimiento y/o liberación de la presión aplicada.

Se ha comprobado que la aplicación de tratamientos con alta presión en distintos equipos y a diferentes escalas, industrial y piloto, da lugar a diferentes distribuciones proteicas, sobre todo en lo que se refiere a la desintegración micelar, puesto que los diferentes equipos proporcionan similares grados de desnaturalización de las proteínas de suero, a niveles de presión equivalentes. Además, la velocidad de despresurización juega un papel fundamental en la distribución de proteínas entre las fases soluble y coloidal de la leche presurizada, ya que el contenido en caseína soluble aumenta significativamente durante la fase de despresurización respecto a la fase de mantenimiento de la presión. Por su parte, la desnaturalización de la  $\beta$ -lactoglobulina tiene lugar fundamentalmente durante la fase de mantenimiento de la presión, produciéndose muy poca desnaturalización durante la fase de despresurización

En comparación con los tratamientos térmicos comúnmente empleados en la industria, los tratamientos con alta presión no producen isomerización de la lactosa, ni avance de la reacción de Maillard y conducen a una menor desnaturalización de las proteínas mayoritarias y minoritarias del suero, por lo que podrían permitir la estabilización de las fórmulas infantiles sin perjudicar su calidad nutritiva. También es posible seleccionar las condiciones del tratamiento con alta presión que permitan producir fracciones proteicas con una concentración de proteína entre el 1.05 y el 1.29 % y una relación de caseínas a proteínas de suero de, aproximadamente, 1.4-1.6, similar a la de la leche humana, aunque contendrían una apreciable proporción de  $\beta$ -Lg desnaturalizada soluble.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**$\alpha$ -La:**  $\alpha$ -lactoalbúmina

**$\beta$ -Lg:**  $\beta$ -lactoglobulina

**4.6:** Fracción soluble a pH 4.6

**Arg:** Arginina

**BSA:** Seroalbúmina bovina

**Ca:** Calcio

**CCP:** Fosfato cálcico coloidal

**CG:** Cromatografía de gases

**CN:** Caseína

**Cys:** Cisteína

**DMF:** N, N-Dimetilformamida

**DTT:** DL-ditiotreitol

**EC:** Electroforesis capilar

**EDTA:** Etilendiaminotetraacetato disódico

**FITR:** Transformada de Fourier

**Fu:** Furosina

**g:** Gramos

**h:** Hora

**IgA:** Inmunoglobulina A secretora

**Igs:** Inmunoglobulinas

**IR:** Tratamiento de presurización en un equipo industrial con despresurización rápida

**kDa:** Kilodaltons

**L:** Litro

**La:** Lactosa

**Lf:** Lactoferrina

**LSD:** Test de la menor diferencia significativa

**Lu:** Lactulosa

**Lys:** Lisina

**Met:** Metionina

**MHEC:** Metilhidroxietil celulosa

**min:** Minutos

**MOPS:** Ácido 3-morfolinopropanosulfónico

**MPa:** Megapascals

**NEM:** N-Etilmaleimida

**NNP:** Nitrógeno no proteico

**OPD:** Ortofenilendiamina

**PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida

**PAGE-SDS:** Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

**PCS:** Espectroscopía de correlación de fotones

**Phe:** Fenilalanina

**pI:** Punto isoelectrico

**PL:** Tratamiento de presurización en un equipo piloto con despresurización lenta

**PP:** Polipropileno

**PR:** Tratamiento de presurización en un equipo piloto con despresurización rápida

**Pro:** Prolina

**RP-HPLC:** Cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa

**SD:** Desviación estándar

**SDS:** Dodecil sulfato sódico

**Seg:** Segundos

**SU:** Sobrenadante de ultracentrifugación

**t:** Tiempo

**TCA:** Ácido tricloroacético

**Tris:** Tris(hidroximetil)aminometano

## **1. INTRODUCCIÓN**



Las proteínas son componentes fundamentales en la nutrición humana, no sólo por ser fuente de nutrientes, sino porque su estructura y propiedades funcionales influyen en gran medida en la calidad de los alimentos. La creciente demanda de productos con mejores cualidades, tanto por su funcionalidad tecnológica y biológica como por sus características organolépticas, ha hecho de las proteínas, sobre todo de las lácteas, una de las mejores herramientas para desarrollar estos nuevos productos tan demandados.

En la actualidad, las proteínas lácteas son utilizadas como ingredientes multifuncionales ya que, además de ser solubles en un amplio rango de pH, de mejorar y de estabilizar geles, emulsiones y espumas, su digestión da lugar a péptidos con actividades fisiológicas, tales como antihipertensiva, antioxidante, etc (Barth y Schlimme, 1988; Bravo y col., 2007, Martínez-Maqueda y col., 2012). Las propiedades derivadas de su estructura y de las interacciones entre proteínas y otros elementos, así como la incidencia de diversos procesos tecnológicos deben conocerse y estudiarse para aprovechar estas proteínas de la manera más eficiente, en la mejora de los productos existentes o en el desarrollo de nuevos productos.

### **1.1. Las proteínas de la leche de vaca**

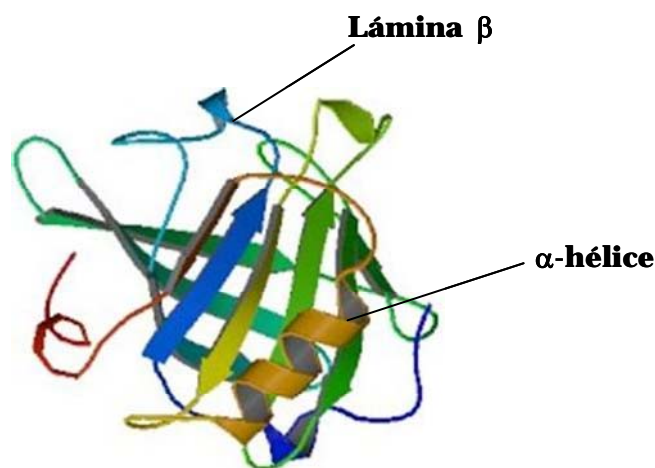
En la leche podemos identificar 2 clases de proteínas: las proteínas de suero y las caseínas. Estas proteínas se separan mediante la acidificación de la leche a pH 4.6, el punto isoeléctrico de las caseínas, que produce su precipitación. Sin embargo, existen otros métodos para inducir su separación con mayor o menor precisión como la ultracentrifugación, la centrifugación después de enriquecer con calcio, ultrafiltración y microfiltración a través de diferentes tamaños de poro, precipitación por etanol o utilizando diferentes sales, etc.

#### **1.1.1. Las proteínas de suero**

Las proteínas de suero se encuentran presentes en la fracción soluble de la leche tras su acidificación a pH 4.6 y representan el 20% de la proteína total. Dentro de esta denominación se incluyen proteínas como la  $\beta$ -Lactoglobulina ( $\beta$ -Lg),  $\alpha$ -Lactoalbúmina ( $\alpha$ -La), seroalbúmina bovina (BSA), lactoferrina (Lf) e inmunoglobulinas (Igs). La proteína mayoritaria es la  $\beta$ -Lg (50 % de la fracción proteica del lactosuero) con un masa molecular de 18.3 kDa (Figura 1). Es una proteína globular que posee 162 aminoácidos, de los cuales 5 son



cisteínas (Cys) implicadas en la formación de puentes disulfuro, uno localizado entre Cys<sup>66</sup>-Cys<sup>160</sup> y otro entre Cys<sup>106</sup>-Cys<sup>119</sup> (Kilara, 2004). La conformación nativa de la proteína consiste en 9 láminas- $\beta$  antiparalelas, de las cuales 8 forman una cavidad hidrofóbica (Zhai y col., 2010). El grupo sulfhidrilo libre de la Cys<sup>121</sup> se encuentra en el interior de la molécula, por lo que, durante la desnaturalización de la proteína, se expone al exterior, aumentando su reactividad para formar puentes disulfuro y contribuyendo a la oligomerización de la proteína (Considine, 2007).



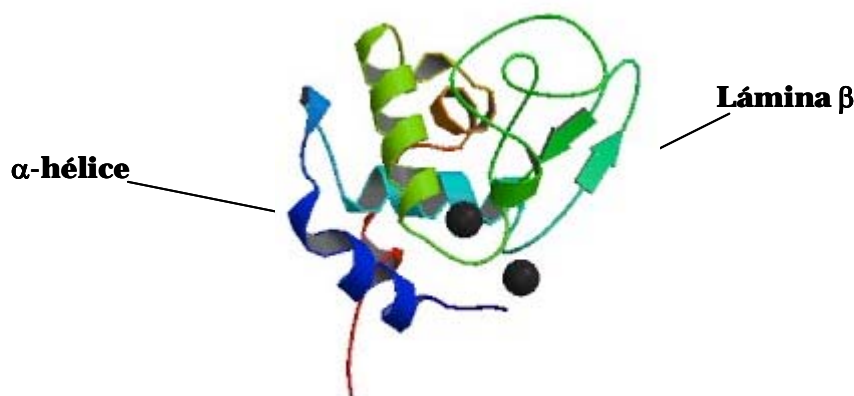
**Figura 1.** Representación de la estructura tridimensional de la  $\beta$ -Lg. Modelo obtenido mediante el software RASMOL a partir de las coordenadas del Protein Data Bank (PD: 1BEB).

La  $\beta$ -Lg puede aparecer en asociaciones diversas dependiendo de la temperatura y del pH. A pH ácido ( $< 3.5$ ) la proteína está en forma monomérica, mostrando una gran estabilidad, aunque podrían formarse algunos dímeros (pH próximo a 3). Entre los pHs 3.5 y 5.2 se forman tetrámeros/octámeros reversibles que no conllevan cambios notables en la estructura secundaria y aparece como un dímero en solución entre pH 5.2 y 7.5. El cambio de monómero a dímero en el intervalo de pH entre 4.5 y 6 produce cambios en la compactación de la proteína, sin embargo, a pH 7 se produce un cambio conformacional entre los residuos 85 y 90 de la proteína, producido posiblemente por una hendidura de los puentes de hidrógeno entre las cadenas F y G. A este cambio conformacional se le denomina transición de Tanford. A pHs superiores a 9 se produce una desnaturalización irreversible del monómero (Caessens y col., 1997; Sakurai y Goto, 2007).

La temperatura es otro parámetro que puede incidir en la estructura y, consecuentemente, en la funcionalidad de la proteína. La desnaturalización térmica de la  $\beta$ -Lg

ocurre entre los 50-90°C, pero es reversible siempre que la temperatura no supere los 65-70°C (Bertrand-Harb y col., 2002; Considine, 2007). Se ha propuesto que, a temperaturas entre 30 y 55°C, la forma dimérica de la  $\beta$ -Lg se disocia a monómeros. A temperaturas superiores, la proteína se despliega incrementando la actividad y oxidación del grupo sulfidrilo (Hambling y col., 1992) y produciéndose cambios estructurales irreversibles que pueden dar lugar a la agregación de las moléculas cuando las temperaturas exceden los 70°C (Bertrand-Harb y col., 2002). La  $\beta$ -Lg resiste en mayor medida la desnaturalización por calor a pH ácido, pero a pH básico se desnaturaliza fácilmente (Caessens y col., 1997). La presión también afecta a su estructura, produciéndose cambios reversibles a partir de 50 MPa e irreversibles a partir de 150 MPa (Tanaka y Kunugi, 1996).

La  $\alpha$ -lactoalbúmina representa el 25% de las proteínas del suero (Figura 2). Es una molécula con 123 residuos aminoácidos, cuatro puentes disulfuro y un masa molecular de 14.2 kDa (Considine y col., 2007). A diferencia de la  $\beta$ -Lg, al no tener grupos sulfidrilo libres, no forma homopolímeros (Monahan y col., 1993). Por su escasa estructura secundaria (30% de  $\alpha$ -hélice y 9% de lámina- $\beta$ ) (Alexandrescu y col, 1993) la molécula tiene una gran flexibilidad. Sin embargo, la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  unidos a su estructura y los puentes disulfuro la mantienen en una compacta estructura helicoidal con una zona interior hidrófoba (Cayot y Lorient, 1997). La estabilidad en su conformación está relacionada con las propiedades del puente de  $\text{Ca}^{2+}$ . A pH <4, el calcio está libre y la  $\alpha$ -La se vuelve flexible y puede proteolizarse fácilmente. Es altamente soluble incluso en su punto isoeléctrico (pI) y, ni la fuerza iónica ni las variaciones de pH, influyen en la solubilidad de esta proteína (Schlimme y Buchheim, 2002).



**Figura 2.** Representación de la estructura tridimensional de la  $\alpha$ -La. Modelo obtenido mediante el software RASMOL a partir de las coordenadas del Protein Data Bank (PD: 1A4V).

Dentro del grupo de proteínas minoritarias de la leche se encuentran proteínas como la BSA, Lf, transferrina, fibronectina, las inmunoglobulinas, enzimas, hormonas peptídicas, etc. Cabe destacar la Lf y la IgA secretora (IgA), que juegan un papel muy importante en la defensa del tracto gastrointestinal y de la mucosa de los recién nacidos. En concreto, la Lf influye en la absorción del hierro, en la respuesta inmune y en la proliferación celular (Lönnerdal, 2009) y la IgA en los mecanismos de defensa gastrointestinal (Bakker-Zierikzee y col., 2006). La Lf es una glicoproteína fijadora de hierro con una masa molecular de 82 kDa, que contiene dos lugares de unión para el hierro por cadena peptídica. Su contenido en la leche es específico y diferente para cada especie y es máximo en el calostro. La leche humana es, en comparación con la leche de vaca, rica en lactoferrina. A mitad de la lactación, la leche humana y la de vaca contienen alrededor de 1.5 y 0.5 g/L, respectivamente (Schlimme y Buchheim, 2002). Las inmunoglobulinas representan al menos el 2 % del total de las proteínas de la leche. Hay 4 tipos de Igs: IgG1, IgG2, IgA y IgM., con una estructura básica similar, compuesta por 2 cadenas ligeras con masas moleculares entre 20-25 kDa, y 2 cadenas pesadas de 50-70 kDa (Kilara, 2004).

### **1.1.2. Las caseínas**

Las caseínas son las proteínas de la leche insolubles a pH 4.6 y representan el 80% del total de proteínas. Están constituidas por 4 proteínas, denominadas  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ -caseínas (CN), que representan el 38, 10, 36 y 12% (3: 0.8: 3:1), respectivamente, del total de las caseínas, con una masa molecular de 20-25 kDa (Schlimme y Buchheim, 2002). En general, las caseínas tienen bajos niveles de estructura secundaria y terciaria, lo que les confiere gran flexibilidad y una estructura fácilmente desnaturizable por agentes como el calor o la urea y susceptible a la acción de las enzimas. Los residuos hidrofóbicos, polares y cargados no se distribuyen uniformemente en las moléculas sino que se concentran en zonas hidrofóbicas o hidrofílicas, confiriendo a sus estructuras un fuerte carácter anfipático y una gran hidrofobicidad superficial, responsable de sus propiedades espumantes y emulgentes. Estas proteínas presentan gran heterogeneidad ya que, durante su formación en la glándula mamaria, sufren cambios en sus estructuras primarias o modificaciones postraduccionales, como fosforilación o glicosilación. En la leche, además, podemos encontrar fragmentos de las anteriores producidos por la acción de diferentes enzimas endógenas en la leche, como la plasmina, que es una serinproteínasa con gran afinidad por las uniones peptídicas de la lisina

(Lys) y, en menor medida, de la arginina (Arg). Todas las caseínas, excepto la  $\kappa$ -CN, son sensibles a esta enzima (Fox y Kelly, 2004).

### $\alpha_{s1}$ -CN

La  $\alpha_{s1}$ -CN es la caseína mayoritaria de las micelas de caseína. Está compuesta por 199 aminoácidos, de los cuales ocho son residuos de serina fosforilados en las cadenas laterales, y posee una masa molecular de 23.62 kDa. En cuanto a su estructura espacial, está formada por un dominio hidrofóbico en el extremo carboxi terminal (100-199), compuesto mayoritariamente por hoja beta, y por un dominio hidrofílico en el extremo amino terminal (1-99). Además, precipita en presencia de iones calcio (Schlimme y Buchheim, 2002).

### $\alpha_{s2}$ -CN

La  $\alpha_{s2}$ -CN, al igual que la anterior, precipita en presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Contiene 207 aminoácidos y una masa molecular de 25.23 kDa. Además, tiene 2 moléculas de Cys en las posiciones 36 y 40 (De Kruif, 2003).

### $\beta$ -CN

La caseína  $\beta$  está compuesta de 209 aminoácidos, de los que 35 son residuos de prolina (Pro) distribuidos uniformemente en la molécula. Esta gran cantidad de prolina previene la formación de  $\alpha$ -hélice, lamina  $\beta$  y giros  $\beta$ . También contiene 5 fosfoserinas en el extremo N-terminal (la fosforilación es variable dependiendo de la variante genética) y ninguna Cys. Es la caseína más anfipática de todas, con un extremo C-terminal fuertemente hidrofóbico (Schlimme y Buchheim, 2002).

### $\kappa$ -CN

La  $\kappa$ -CN está compuesta por 169 aminoácidos y una masa molecular de 19kDa. En su estructura tiene 2 Cys y entre 3 y 6 moléculas de galactosa, N-acetilglucosamina y ácido N-acetilneuramínico unidas mediante enlaces O-glicosídicos a serina ( $\text{Ser}^{141}$ ) o treonina ( $\text{Thr}^{131, 133, 135}$  y  $142$ ). La región N-terminal es hidrofóbica y la C-terminal, que es hidrofílica, contiene las variantes genéticas y las variaciones postraduccionales (los oligosacáridos y los grupos fosfato) y posee una fuerte carga neta negativa (Fox y Kelly, 2004).

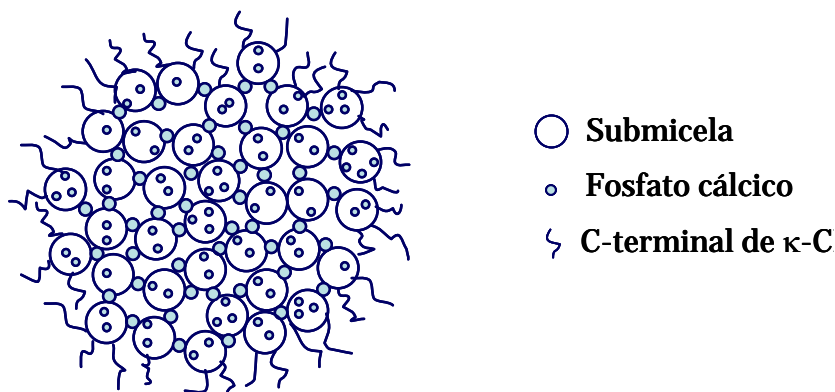
Las caseínas sensibles al Ca precipitan a concentraciones de Ca <6mM. Sin embargo, en la leche se disponen en micelas lo que les permite ser estables a concentraciones 30 mM de Ca. La principal responsable de la estabilización de la micela de caseína es la  $\kappa$ -CN que puede unir de 8 a 10 veces su peso de caseínas sensibles al Ca (Fox y Kelly, 2004; Fox y Brodkord, 2008).

### **1.1.3. La micela de caseína**

En la leche, las caseínas forman asociaciones coloidales llamadas micelas, con un tamaño comprendido entre 50-300 nm (media 120 nm) y una masa molecular entre  $10^6$  y  $3 \times 10^9$  Da (media  $10^8$  Da) (Fox y Kelly, 2004). Las micelas están altamente hidratadas (2-3 g de H<sub>2</sub>O/g de proteína) y contienen, aproximadamente, un 6% de materiales inorgánicos principalmente calcio y fosfato, que se conocen como fosfato cálcico coloidal (CCP) (Lucey y col., 1996). Estas micelas confieren a la leche una serie de propiedades muy importantes tecnológicamente, como su color, estabilidad al calor y al etanol, aptitud a la coagulación y acidificación, etc.

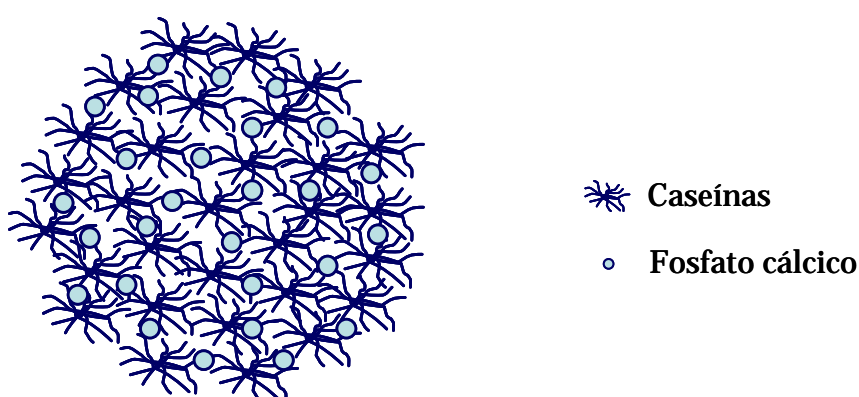
A pesar de que las micelas de caseína se han estudiado durante muchos años, aún no existe total consenso sobre la estructura de la micela. La mayoría de los modelos estructurales propuestos coinciden en que la  $\kappa$ -CN está localizada mayoritariamente en la superficie, jugando un papel esencial en la regulación del tamaño micelar y en el mantenimiento en suspensión de las caseínas en la leche. La proporción de  $\kappa$ -CN varía en relación inversa con el tamaño de la micela, mientras que la de  $\beta$ -CN lo hace en forma directa (Riel, 1991; Ferrandini y col., 2006).

El modelo más apoyado es aquel que define a la micela como una estructura formada por la agrupación de submicelas más pequeñas, unidas mediante interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y/o CCP, recubiertas por una fina capa hidrofílica (5-10 nm). Esta capa, que estaría formada por el extremo C-terminal de la  $\kappa$ -CN, con o sin otros extremos hidrofílicos de otras caseínas ( $\alpha$ s<sub>1</sub>- y  $\beta$ -CN) dependiendo del autor a seguir (Morr, 1967; Waugh, 1971; Slattery, 1976; Schmidt, 1982; Walstra y Jenness, 1984), estabiliza a la micela por medio del aumento del potencial zeta (-20mV). Además, el CCP también podría localizarse dentro de la submicela (Figura 3) (Walstra y col., 1999).



**Figura 3.** Esquema del modelo de estructura de las micelas de caseína propuesto por Walstra (1999).

Los últimos modelos propuestos retienen dos de las principales características del modelo de la submicela, como son el papel que juega el CCP en la cementación de la micela y el de la  $\kappa$ -CN estabilizando la micela por su localización en la capa superficial, pero difieren, principalmente, en la composición de la estructura interna de la micela en forma de submicelas (Visser, 1992; Holt, 1992; Horne 1998, 2002). En concreto, y entre otros, el modelo propuesto por Visser (1992) presenta a la micela como conglomerados esféricos de moléculas de caseína agregadas al azar y, el de Holt (1992, 1994), como una enredada red de moléculas de caseína flexibles formando una estructura parecida a un gel (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema del modelo de estructura de las micelas de caseína propuesto por Holt (1992).

### 1.1.3.1. Factores que afectan a la estabilidad de la micela

Las micelas de caseína no se pueden considerar estructuras estables, sino que se encuentran más bien en un equilibrio dinámico con el medio acuoso circundante, el suero lácteo. La estructura y la estabilidad de las micelas de caseína se modifican, por ejemplo, a consecuencia de las siguientes modificaciones (Fox y Kelly, 2004):

- Las variaciones en la proporción entre el fosfato cálcico coloidal y el disuelto en el suero modifican el tamaño de la micela. Si se acompleja el calcio libre, sin cambiar el pH, o si se elimina mediante diálisis frente a una disolución libre de calcio, las micelas se disgregan, y en casos extremos incluso dan lugar a fragmentos micelares.
- El almacenamiento de leche cruda en frío durante un tiempo prolongado influye especialmente en la  $\beta$ -CN que, debido al debilitamiento de las interacciones hidrofóbicas, se disocia de las micelas y pasa al suero lácteo. Sin embargo, este hecho no conduce a una desestabilización profunda de las micelas y puede revertirse parcialmente si se recalienta ligeramente la leche.
- Al calentar la leche a temperaturas superiores a 70°C se produce una agregación creciente de las proteínas del suero, especialmente de la  $\beta$ -Lg, con la  $\kappa$ -CN. Estos complejos de caseína-proteína de suero confieren a las micelas de caseína propiedades diferentes, por ejemplo en la coagulación por acidificación o por hidrólisis enzimática, como se explica más adelante. A la particular interacción entre la  $\beta$ -Lg y la  $\kappa$ -CN micelar se le considera una propiedad tecnológica de extraordinaria importancia, ya que permite esterilizar la leche sin que flocule a pesar de la casi completa desnaturalización de las proteínas del suero.
- La bajada del pH en la leche produce la solubilización del fosfato cálcico coloidal y, por debajo de pH 5.2, las micelas de caseína empiezan a formar agregados que precipitan en su pI (pH 4.6). Estos agregados se vuelven a disolver cuando el pH sube a la neutralidad, aunque las micelas no vuelven a su estado natural. En la estructura de la micela de caseína de la leche acidificada influye la temperatura, así como los

tratamientos térmicos previos a la acidificación, que producen la deposición de proteínas séricas desnaturalizadas sobre la superficie de la micela.

- Las micelas de caseína también pueden coagular por reacciones enzimáticas. La quimosina escinde específicamente a la  $\kappa$ -CN a pH 6.7 en el enlace Phe<sup>105</sup>-Met<sup>106</sup> dando lugar al caseinomacropéptido soluble (región C-terminal) y a la para- $\kappa$ -CN insoluble. Cuando se ha escindido la mayor parte de la  $\kappa$ -CN, comienza la coagulación de las micelas. El proceso de coagulación depende en gran medida de la temperatura y de la concentración de iones calcio. Un precalentamiento intenso de la leche, que conduce a la unión de proteínas del suero desnaturalizadas a la  $\kappa$ -CN que recubre a las micelas, dificulta o impide el proceso de coagulación enzimática.
- El tratamiento de las micelas de caseína a elevadas presiones hidrostáticas (por ejemplo, 200 MPa, 5 min, 20°C) produce su descomposición en subunidades o pequeños agregados, como se explicará posteriormente.

## **1.2. Nuevas técnicas de procesamiento de alimentos**

La utilización de altas temperaturas durante el procesamiento de los alimentos produce daños en los componentes termolábiles como las proteínas, a las que causa desnaturalización y agregación, además de pérdida de propiedades nutritivas y organolépticas. Sin embargo, el procesamiento de los alimentos es necesario, ya que proporciona productos microbiológicamente seguros y con una larga vida útil. Por ello, en los últimos 20 años, tanto los científicos como la industria alimentaria, se han concentrado en estudiar y desarrollar nuevas técnicas de procesamiento de alimentos que produzcan menores efectos en sus cualidades, con el fin de obtener productos con características cada vez más similares a las de los productos frescos, aunque con una mayor vida útil.

Estas tecnologías emergentes se pueden dividir en térmicas y no térmicas. El término de procesamiento no térmico es utilizado normalmente para denominar aquellas tecnologías que son efectivas a temperatura ambiente o subletal. Sin embargo, durante el procesamiento con estas técnicas se pueden producir aumentos de temperatura, de modo que la eficacia del tratamiento



depende muchas veces de la combinación de ambos factores (Cullen y col., 2012). En la Tabla 1 se muestran ejemplos de ambos tipos de tecnologías.

**Tabla 1.** Ejemplos de tecnologías emergentes de procesado y conservación de alimentos.

<i>Tratamientos térmicos</i>	<i>Tratamientos no térmicos</i>
<p>Microondas</p> <p>Radio frecuencia</p> <p>Calentamiento óhmico</p> <p>Calentamiento inductivo</p>	<p>Altas presiones hidrostáticas</p> <p>Pulsos eléctricos de alta intensidad de campo</p> <p>Irradiación</p> <p>Ultravioleta</p> <p>Ultrasonido</p> <p>Plasma frío</p> <p>Ozono</p> <p>Dióxido de carbono</p> <p>Agua supercrítica</p>

En la actualidad, muchas de estas técnicas ya son utilizadas en la industria alimentaria como las altas presiones hidrostáticas, la irradiación, el ozono, etc. (Barbosa-Canovas y Bermúdez-Aguirre, 2010).

### **1.2.1. Tratamientos con altas presiones**

El tratamiento con altas presiones es una tecnología novedosa de procesado, de interés comercial por su capacidad de aumentar la seguridad y la vida útil de los alimentos, sin pérdidas indeseables de cualidades sensoriales y nutricionales. Un valor añadido de estos tratamientos reside en su capacidad de modificar la funcionalidad y mejorar las propiedades reológicas de éstos. En la actualidad, las altas presiones constituyen la tecnología más desarrollada comercialmente, dentro de los métodos de conservación alternativos.

La tecnología de alta presión se utilizó originariamente en la producción de cerámicas, aceros y superaleaciones. A finales del siglo XIX surge la aplicación de las altas presiones a

alimentos con Regnard (1884), Roger (1885) y Hite (1899) que aplicaron con éxito las altas presiones a leche, carne y alimentos basados en frutas, para estudiar su efecto en la microbiota de esos productos. No obstante, no fue hasta casi un siglo después cuando se comenzó a aplicar esta técnica a alimentos a escala industrial, debido a que los problemas tecnológicos que derivan de la aplicación de tan elevadas presiones supusieron un freno para el desarrollo de esta técnica. Los primeros productos presurizados fueron mermeladas, salsas para ensaladas, zumos y diferentes clases de yogures de frutas, que se comercializaron en 1992 en Japón, probablemente por ser este país el pionero y líder en la fabricación de cámaras de alta presión (Okpala y col., 2010).

Actualmente, la implantación de los equipos de alta presión en la industria alimentaria es cada vez mayor (había 132 equipos de alta presión en el 2009 en todo el mundo, Barbosa-Cánovas y Bermúdez-Aguirre, 2012), al igual que los productos tratados, utilizándose para destruir microorganismos, inactivar enzimas o modificar proteínas. Además, en algunos casos, las altas presiones permiten ejecutar y/o reducir el tiempo de algunas tareas, no posibles o costosas de realizar por otros métodos de procesado, sin pérdidas de sus cualidades nutricionales o sensoriales, por ejemplo, la abertura de las conchas de ostras u almejas (300 MPa, 1 min). La empresa japonesa Echigo Seika utiliza presiones entre 200-400 MPa para modificar sin calor las proteínas y el almidón de algunos cereales, además de la velocidad de penetración del agua en el grano. De esta manera, se obtienen cereales más dulces y digestivos, que el consumidor prepara en 3 min al microondas, e incluso cereales hipoalergénicos. Por otro lado, Fonterra comercializa calostro presurizado a 500 MPa preservando compuestos bioactivos sensibles al calor (Lf, Igs y factores del crecimiento) (Tonello, 2011).

#### **1.2.1.1. Fundamentos de los tratamientos con alta presión**

Se entiende por altas presiones la aplicación de presiones comprendidas entre 100 y 1000 MPa a un líquido en el que se sumergen los productos que van a ser sometidos al tratamiento (Raventòs, 2005). Generalmente suele utilizarse agua debido a su baja compresibilidad, de ahí que se le denomine también alta presión hidrostática. Esta técnica se basa en dos principios (Cheftel 1991):

- El primero indica que la presión se transmite de manera uniforme e instantánea a través de todo el material biológico, tratándose así de un proceso isostático. Esto hace que el proceso sea homogéneo, evita la presencia de zonas sobretratadas y la deformación del producto.
- El segundo se refiere al principio de Le Chatelier, que indica que los fenómenos acompañados de una disminución de volumen (reacciones químicas, modificación de las conformaciones moleculares) son favorecidos por un aumento de presión y viceversa. Según este principio la aplicación de alta presión desplaza el equilibrio de las reacciones hacia el estado que ocupa menos volumen. En principio, en una macromolécula proteica, la formación de enlaces de hidrógeno, la ruptura de interacciones hidrofóbicas y de pares de iones se acompañan de una restricción de volumen y se ven favorecidos por la presión (Cheftel, 1991). Sin embargo, otros estudios suponen que los puentes de hidrógeno son prácticamente insensibles a la presión (Mozhaev, 1994).

#### **1.2.1.2. Equipos de alta presión**

Los equipos de alta presión están formados por un recipiente donde se aplica la presión (cámara de presión), un dispositivo de generación de presión, generalmente una bomba hidráulica, y un sistema manual o automático para el control de las condiciones del proceso (Zhou y col., 2010). El componente más importante es la cámara de presión y sus cierres. El espesor de la pared de la cámara determina la presión máxima que puede alcanzar el equipo, el diámetro del cilindro y el número de ciclos para los que se ha diseñado (Mertens y Deplace, 1993). La cámara de presurización más simple es la monobloque, formada por un cilindro de diámetro interno de menos de 15 cm. Generalmente el uso de estas cámaras está limitado a presiones de trabajo inferiores a 400 MPa, porque su pared es delgada (Ting, 2011). Sin embargo, con el desarrollo de las paredes multicapas, de mayor espesor, se han construido equipos de laboratorio capaces de alcanzar los 1400 MPa y con capacidad para 35 mL (como los fabricados por Stansted Fluid Power en el Reino Unido), además de equipos a escala piloto e industriales. De forma general, ya que dependiendo del fabricante las características de los equipos varían, el diámetro de las cámaras de los equipo piloto es de unos 100 mm, con capacidad para unos pocos litros y pueden presurizar hasta 900 MPa en un intervalo de temperatura ente 5 y 100°C. Los equipos industriales, por otro lado, permiten

presurizar alimentos hasta 600-630 MPa, en el intervalo de temperatura de 5-30°C. En este caso, las cámaras tienen un diámetro entre 200 y 380 mm, albergando entre 55 y 420 L. En los más pequeños (55 L) se ha podido aumentar la temperatura hasta 90°C (NC Hyperbaric, España).

Otro de los componentes a destacar es el sistema de cierre, que varía dependiendo de la aplicación que se desee. Así, los cierres de rosca discontinua o de apertura y cierre rápidos son idóneos para periodos cortos de presurización, ya que permiten minimizar el tiempo de apertura y cierre y maximizar la productividad de la cámara (número de ciclos por unidad de tiempo), lo cual es muy importante para la viabilidad económica del tratamiento de alta presión. Sin embargo, cuando el tiempo de apertura y cierre de la cámara es despreciable en comparación con la duración total del ciclo de procesado, se utilizan cierres de rosca continua, más económicos (Raventòs, 2005).

Durante el tratamiento de presurización, la presión se transmite al alimento por medio de un fluido transmisor, cuya elección varia dependiendo del material con el que esté fabricada la cámara, ya que puede corroerla. Si es de acero inoxidable, permite el uso de agua como medio transmisor. Sin embargo, pueden usarse otros líquidos como aceite de ricino, aceite de silicona, mezclas de agua y glicol etc. La compresión producida por la aplicación de presión en el fluido transmisor y en el alimento produce el aumento de la temperatura durante el tratamiento, es a lo que se le denomina calentamiento adiabático. El incremento en la temperatura va a depender de la temperatura de partida y de la composición del alimento o del fluido transmisor, variando dependiendo de sus características térmicas y físicas. A modo de ejemplo, el calor de compresión del agua es de 3°C por cada 100 MPa, mientras que el del aceite de silicona es de alrededor 20°C por cada 100 MPa. La utilización de agua como fluido transmisor es preferible ya que el comportamiento del calentamiento adiabático del agua es similar al de la mayoría de los componentes de los alimentos, lo cual permitiría mimetizar el gradiente térmico entre el fluido transmisor de la presión y el alimento. Además, el agua tiene bajo coste, no es tóxico y se puede conseguir fácilmente (Nguyen y Balasubraniam, 2011).

#### 1.2.1.2.1. Tipos de equipos de alta presión

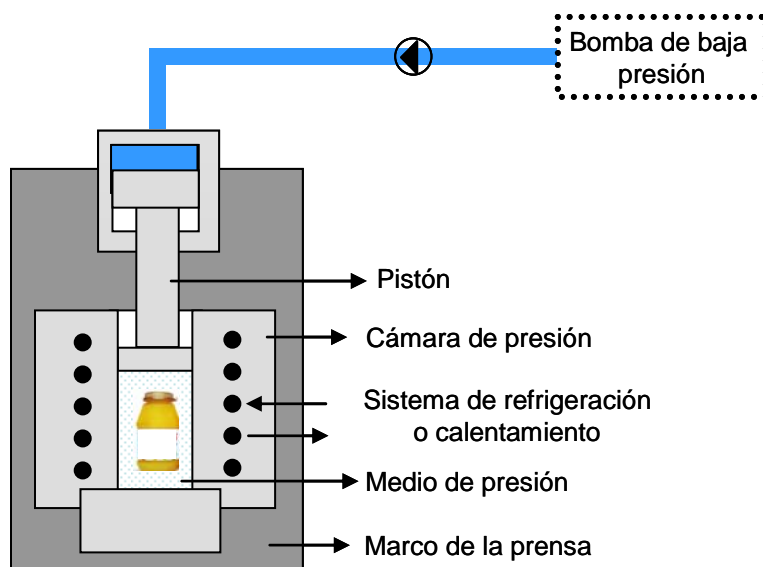
Tras introducir el producto a presurizar dentro de la cámara, ésta se cierra y se llena con el líquido transmisor de la presión. Llegados a este punto, unas bombas generan la presión deseada y el producto se presuriza. Existen diferentes tipos de equipos de alta presión dependiendo del producto a tratar: el tipo discontinuo, que se utiliza normalmente para productos sólidos o líquidos previamente envasados, y el tipo semicontinuo para líquidos no envasados.

- *Equipos de alta presión discontinuo*

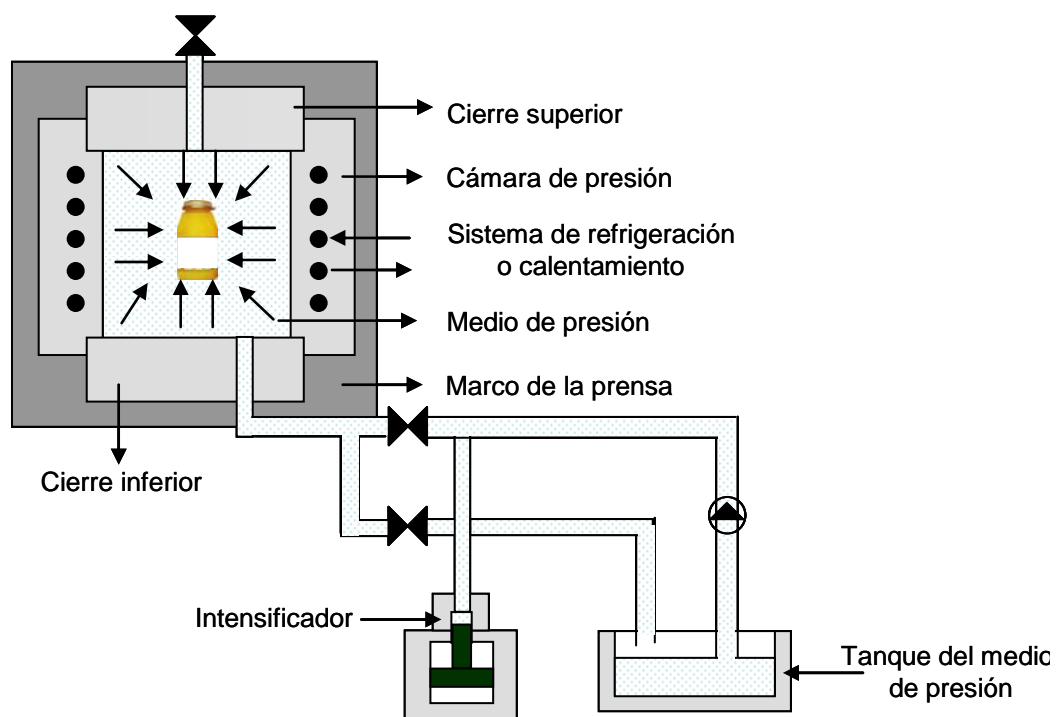
Son los más utilizados y se denominan así porque el producto a tratar, bien líquido o sólido, está envasado cuando se introduce en la cámara de presión. La generación de la presión puede hacerse de dos formas:

- a) Por compresión directa, de modo que la presión se genera en el medio de transmisión por la parte final de un pistón. Este método permite una compresión muy rápida, pero las limitaciones que impone el cierre dinámico entre el pistón y la superficie interna de la cámara restringen su uso a diámetros pequeños, típicos de sistemas a escala de laboratorio o a escala piloto (Figura 5).
- b) Por compresión indirecta. Estos equipos utilizan un intensificador de alta presión para bombear el medio transmisor de la presión desde un tanque hasta la cámara, ya cerrada, hasta conseguir la presión deseada. La mayoría de los sistemas industriales de presión isostática utilizan este método de compresión (Figura 6) (Hogan y col., 2005; Raventós, 2005).

Los envases utilizados deben ser flexibles y se han de poder sellar herméticamente. Algunos de los polímeros utilizados son el polietileno de baja densidad (LDPE), la goma EVA (etilen vinil acetato), el polipropileno (PP) etc. (Balasubramaniam y col., 2004). Además, debe evitarse la presencia de aire en el producto envasado, ya que la presencia de éste puede incrementar el riesgo de ruptura del envase durante el tratamiento.



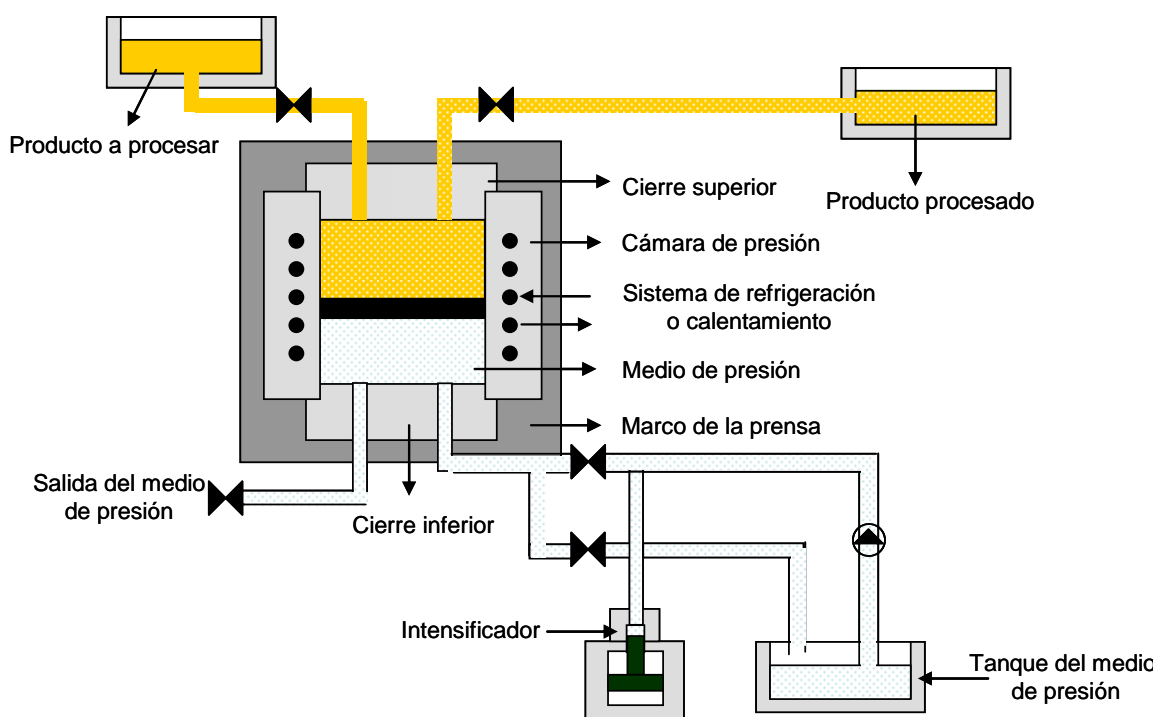
**Figura 5.** Esquema del diseño de un equipo de altas presiones con generación de presión por el método de compresión directa (adaptado de Raventós, 2005).



**Figura 6.** Esquema del diseño de un equipo de altas presiones con generación de presión por el método de compresión indirecta (adaptado de Daoudi, 2004).

- Equipos de tipo semicontinuo

Son utilizados con productos que pueden ser bombeados. En primer lugar, el alimento se introduce en la cámara de presión, entrando en contacto directo con el acero de la cámara, que debe ser adecuado para este fin y no experimentar corrosión durante su utilización. Posteriormente, el alimento es comprimido por el líquido transmisor de la presión que está al otro lado de un pistón. En estos equipos se utiliza una compresión directa para generar la presión. Finalmente, el alimento presurizado es evacuado de la cámara a través de una válvula aséptica de alta presión (Figura 7) (Balasubramaniam y col., 2008). Estos sistemas tienen mejor rendimiento y mejor aprovechamiento de la energía utilizada, con el inconveniente de un coste inicial mayor (Ting y Marshall, 2002; Hogan y col., 2005).



**Figura 1.7.** Esquema del diseño de un equipo de altas presiones de tipo semicontinuo (adaptado de Daoudi, 2004).

De entre estos dos diseños, los más utilizados son los que presurizan alimentos previamente envasados, ya que de esta manera se elimina el riesgo de contaminación del producto con algún componente presente en el medio de presurización en de la maquinaria, así como la posible contaminación de la cámara con el alimento y la necesidad de limpiarla después de cada aplicación, disminuyendo, de esta manera, los costes de mantenimiento.

### **1.2.1.3. Efecto de la alta presión sobre las proteínas**

Las altas presiones hidrostáticas producen la desnaturalización de las proteínas, alterando el delicado equilibrio que existe entre las interacciones que estabilizan la conformación plegada de las proteínas nativas (Masson, 1992). Las dianas de los tratamientos con alta presión son las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, cuya destrucción se acompaña de una disminución de volumen. La formación de puentes de hidrógeno es casi insensible a la presión, al igual que los enlaces covalentes que prácticamente no se modifican hasta los 1000 MPa (Masson, 1992). La aplicación de alta presión induce cambios locales o globales en la estructura de las proteínas, que pueden conducir a la desnaturalización (Mozhaev y col., 1996). Presiones de 100-200 MPa son suficientes para provocar la disociación de las proteínas poliméricas y de complejos multi-proteína (Silva y Weber, 1993), mientras que las proteínas monoméricas suelen desnaturalizarse entre 400 y 800 MPa (Heremans, 1982).

La exposición de residuos hidrofóbicos ocultos al agua y su resultante hidratación durante el desplegamiento causa una disminución del volumen molar parcial de la proteína. La hidratación de los grupos hidrofóbicos expuestos juega un papel decisivo en la estabilidad termodinámica de la proteína y puede, además, ser considerada como un importante factor para entender la modificación de su funcionalidad como resultado de los tratamientos de alta presión. La disociación en subunidades y los desplegamientos localizados pueden exponer grupos escondidos, que podrían unirse con otros grupos nuevamente expuestos y así producir agregación (Masson, 1992).

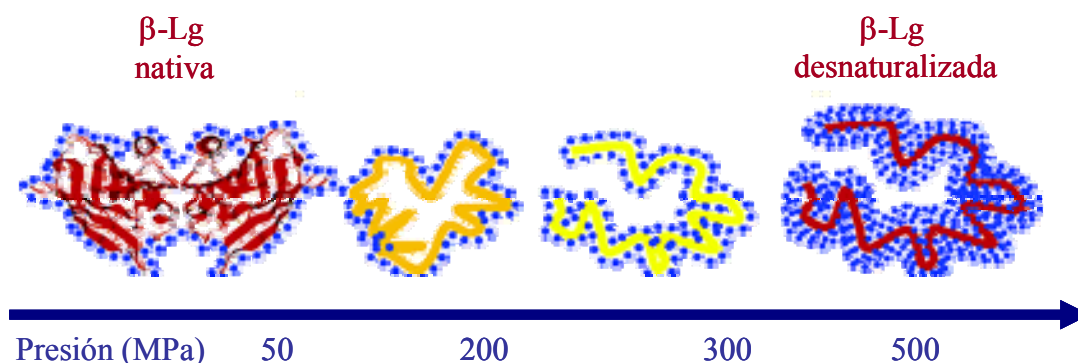
#### **1.2.1.3.1. Efecto de la alta presión sobre las proteínas de suero**

Los estudios realizados sobre la desnaturalización por presión de las proteínas de suero se centran en las proteínas mayoritarias, sobre todo en la  $\beta$ -Lg y  $\alpha$ -La, ya que éstas son las principales responsables de las propiedades de interés tecnológico. Los tratamientos con alta presión producen la desnaturalización de las proteínas del suero. El efecto va a depender de diferentes factores, entre otros, la estructura de la proteína, la presión utilizada, el tiempo de duración del tratamiento (López-Fandiño y col., 1996; Huppertz y col., 2004 a,b; Hinrichs y Rademacher, 2004), la temperatura (Gaucheron y col., 1997; López-Fandiño y Olano, 1998;



García-Risco y col., 2000; Hinrichs y Rademacher, 2004; Huppertz y col., 2004b), el pH de la leche (Arias y col., 2000; Huppertz y col., 2004a), etc.

De las proteínas mayoritarias del suero lácteo, la  $\beta$ -Lg es la más sensible a los tratamientos con alta presión (Patel y col., 2005). Estos tratamientos producen el desplegamiento de la  $\beta$ -Lg como se muestra en la Figura 8.



**Figura 8.** Cambios en la estructura de la  $\beta$ -Lg presurizada (adaptada de Orlie y col., 2007).

A pH 4, la  $\beta$ -Lg está en forma de dímero y al aplicarle presiones  $< 200$  MPa se produce la disociación de éste, lo que conlleva un aumento de la hidratación de la proteína. El agua penetra en su interior y produce cambios reversibles en su conformación estructural. La proteína está parcialmente plegada pero sin estructura terciaria específica (Orlien y col., 2007). Panick y col. (1999) observaron mediante espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTR) una disminución de la cantidad de lámina- $\beta$  y  $\alpha$ -hélice. A presiones  $> 200$  MPa, la desnaturalización de la proteína aumenta con el nivel de presión, ya que se hidrata cada vez más, perdiendo su estructura terciaria a 500 MPa (se van rompiendo los puentes de hidrógeno intramoleculares y se van formando interacciones intermoleculares entre el agua y los nuevos residuos aminoacídicos expuestos) (Orlien y col., 2007), sin embargo, la desnaturalización no es completa hasta los 1000 MPa (Panick y col., 1999).

Las altas presiones también pueden producir la agregación de la  $\beta$ -Lg, ya que el desplegamiento de su estructura ocasiona un incremento en la hidrofobicidad de la proteína, aumentando de esta manera la interacción entre moléculas. Además, durante la presurización se pueden dar oxidaciones de los grupos sulfidrilo o, más probablemente, reacciones de intercambio sulfidrilo-disulfuro, en las que juega un papel importante el grupo sulfidrilo libre,

de esta proteína expuesto por efecto de la presurización, y que causan la agregación de la  $\beta$ -Lg (López-Fandiño y col., 1996; López-Fandiño, 2006a). Estos puentes disulfuro de nueva creación son estables una vez que se elimina la presión.

La  $\alpha$ -La es menos sensible a la presión que la  $\beta$ -Lg, debido a que su estructura molecular es más rígida por la presencia de un mayor número de puentes disulfuro intramoleculares (4 frente a 2) y sitios de unión al  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta proteína empieza a desplegarse a presiones de 200 MPa, aunque estos cambios son reversibles hasta presiones de 400 MPa. A presiones comprendidas entre 200 y 400 MPa, la  $\alpha$ -La está en un estado intermedio de desnaturalización, en la que la proteína mantiene su estructura secundaria, pero tiene una estructura terciaria muy poco definida. A este estado de desnaturalización de la proteína se le denomina en inglés *molten globule* (López-Fandiño, 2006b).

A diferencia de la  $\beta$ -Lg, las altas presiones no producen la oligomerización de la  $\alpha$ -La por si sola, incluso aunque se le apliquen largos periodos de presión. Sin embargo, en mezclas de  $\alpha$ -La y  $\beta$ -Lg, y debido al grupo sulfidrilo libre de esta última, la  $\beta$ -Lg puede provocar la oligomerización de la  $\alpha$ -La, llegando a producir la formación de una gran población de oligómeros compuestos, presumiblemente, por varios cientos de moléculas de  $\alpha$ -La y  $\beta$ -Lg (Grinberg y Haertlé, 2000; López-Fandiño, 2006b).

En el caso de la BSA de leche bovina, López-Fandiño y col. (1996) indicaron que esta proteína no se desnaturaliza a presiones entre 100 y 400 MPa. Esta gran baroestabilidad se relaciona con el hecho de que la BSA tiene una estructura molecular extremadamente rígida con 17 puentes disulfuro intramoleculares. Además, estudios realizados a 800 MPa mostraron que la estructura secundaria de la proteína se ve sustancialmente afectada por esta presión, aunque los cambios son mayoritariamente reversibles. Sin embargo, a muy altas presiones la BSA puede también polimerizarse a través de uniones disulfuro mediadas por su grupo sulfidrilo libre (López-Fandiño, 2006b).

En relación al efecto de las altas presiones sobre otras proteínas minoritarias, como Lf e inmunoglobulinas, no existen estudios que indiquen el grado de desnaturalización o pérdida de solubilidad de éstas, por lo que queda patente la necesidad de determinar el daño que pudieran sufrir por estos tratamientos.

Por otro lado, se ha observado que la desnaturalización de las seroproteínas producida por la presión es mayor cuando se presuriza leche que suero de quesería (Huppertz y col., 2004b). La presurización de la leche a  $\geq 100$  MPa, 25°C produce una progresiva desnaturalización de la  $\beta$ -Lg, estimada mediante la pérdida de solubilidad a pH 4.6, mientras que la  $\alpha$ -La y la BSA son resistentes hasta presiones de 400 MPa (López-Fandiño y col., 1996). A presiones de 200 y 400 MPa, aplicadas a temperatura ambiente durante 15-30 min, el porcentaje de desnaturalización de la  $\beta$ -Lg es de 14-16 y 82-90%, respectivamente (García-Risco y col., 2003; Huppertz y col., 2004b) mientras que a 600 MPa en las mismas condiciones solamente se desnaturaliza un 15-33 % de  $\alpha$ -La (Needs y col., 2000; Huppertz y col., 2004b).

Además del nivel de presión, la temperatura es otro de los factores que influyen en el grado de desnaturalización de las proteínas durante la presurización. López-Fandiño y Olano (1998a) observaron que un incremento en la temperatura del tratamiento de alta presión hasta 60°C no desnaturaliza la  $\beta$ -Lg a 100 MPa pero, a presiones superiores, la desnaturalización se incrementa a medida que aumenta la temperatura. También detectaron casi un 60 % de desnaturalización de la  $\alpha$ -La tras tratamientos a 400 MPa y 60°C.

El pH también es otro factor determinante. El pH alcalino favorece considerablemente la desnaturalización de la  $\beta$ -Lg como resultado del tratamiento de alta presión de la leche debido a que aumenta la reactividad de los grupos sulfidrilo, mientras que el pH ácido reduce la desnaturalización (Arias y col., 2000; Huppertz y col., 2004a).

Como ya se ha indicado, las proteínas de suero,  $\beta$ -Lg y  $\alpha$ -La, son más susceptibles a la desnaturalización inducida por la alta presión en la leche que en el suero, probablemente debido a la ausencia de caseínas y a la menor concentración de calcio de este último (Hinrichs y Rademacher, 2005; Huppertz y col., 2004b). Se ha sugerido la posibilidad de que la  $\beta$ -Lg desnaturalizada pueda unirse, mediante enlaces disulfuro, a la  $\kappa$ -CN (López-Fandiño y col., 1997; Nabhan y col., 2004) y a la  $\alpha_{s2}$ -CN y así, formar agregados proteicos (Patel y col., 2006). Además, el calcio podría facilitar el acercamiento de las proteínas de suero desplegadas a otras proteínas a través de la neutralización de cargas. De hecho, se ha observado que la desnaturalización de  $\beta$ -Lg y  $\alpha$ -La inducida por presiones de hasta 800 MPa

se puede prevenir mediante la presencia de agentes bloqueantes de grupos sulfidrilo y reducir mediante la eliminación de CCP (Huppertz y col., 2004b).

Así, en suero presurizado una importante proporción de las proteínas desnaturalizadas permanece soluble, puesto que la concentración de caseínas es mínima (Huppertz y col., 2004a). En la leche, la  $\beta$ -Lg desnaturalizada por presión se encuentra asociada a la micela de caseína, de manera análoga a lo que ocurre tras los tratamientos térmicos (Scollard y col., 2000), aunque también puede permanecer en solución (García-Risco y col., 2003), ya sea en forma de agregados formados exclusivamente por proteínas de suero o asociada a partículas de caseína demasiado pequeñas para ser sedimentadas (López-Fandiño y col., 1998; Huppertz y col., 2004a). Ye y col. (2004) también observaron algunas moléculas de  $\alpha$ -La y  $\beta$ -Lg asociadas a la membrana del glóbulo de grasa lácteo.

La asociación de la  $\beta$ -Lg con las micelas de caseína inducida por las altas presiones afecta a varias propiedades tecnológicas de la leche, por ejemplo, dificulta la coagulación enzimática (Zobrist y col., 2005). Por otra parte, la interacción entre la  $\alpha$ -La y la  $\beta$ -Lg puede obstaculizar la aglutinación de los glóbulos de grasa inducida por frío y reducir la separación de la grasa en la leche presurizada (Huppertz y col., 2006).

#### **1.2.1.3.2. Efecto de las altas presiones sobre las micelas de caseína**

Los tratamientos con alta presión pueden causar modificaciones sustanciales en las micelas de caseína. De forma general, estos tratamientos producen la disgregación de la micela de caseína, la cual se reorganiza en partículas más pequeñas e irregulares, dejando libres pequeños fragmentos micelares o moléculas individuales de caseínas no sedimentables, junto con calcio y fósforo (López-Fandiño y col., 1998). Así, se modifica el número, el tamaño y la composición de las micelas, lo que da lugar a cambios en las propiedades ópticas de la leche, como disminución de la turbidez y cambios en la apariencia visual (Needs y col., 2000a). Estas nuevas micelas generadas por la presión están más hidratadas que sus predecesoras (Gaucheron y col., 1997; Huppertz y col., 2004c) ya que, por un lado, la hidratación aumenta con la reducción del tamaño de la micela y es mayor para partículas amorfas que para esféricas (Huppertz y col., 2006) y, por otro lado, la asociación a

éstas de la  $\beta$ -Lg desnaturalizada aumenta la carga negativa y la solvatación micelar (Huppertz y col., 2004c).

La disgregación micelar es consecuencia del debilitamiento de las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas que existen entre las caseínas (Johnston y col., 1992; Needs y col., 2000a, b). Además, la ruptura de pares iónicos inducida por la presión altera la red de CCP que estabiliza a la micela (Schrader y Buchheim, 1998; Huppertz y col 2004a, b). Así, los tratamientos con altas presiones originan la solubilización del CCP, lo que conduce a un aumento considerable de la concentración de minerales en la fase sérica (Huppertz y col., 2006c). Entre 100 y 400 MPa se produce un incremento lineal en los niveles de Ca, P y Mg (López-Fandiño y col., 1998; Hubbard y col., 2002), lo cual indica una progresiva solubilización del CCP a medida que aumenta la presión, que conduce a la pérdida de la integridad micelar. Parámetros como el nivel de presión, el tiempo de presurización, la velocidad de despresurización, la temperatura y las condiciones del entorno (contenido en calcio y caseína, pH) influyen en las propiedades de las micelas en la leche presurizada.

El nivel de presión es el parámetro que más influye en los cambios micelares. La utilización de presiones < 200 MPa, a 20°C, casi no modifica el tamaño de la micela de caseína, aunque dependiendo del estudio se han indicado pequeños incrementos o reducciones en su tamaño medio (Needs y col., 2000b; Huppertz y col., 2004a; Anema, 2008). Sin embargo, sí se produce disgregación micelar, estimada a través del contenido en caseína no sedimentable (García-Risco y col., 2003), y aumento del volumen hidrodinámico de la micela. Además, a partir de los 100 MPa comienza a disminuir la turbidez de la leche (Regnault y col., 2004).

A partir de los 200 MPa, en tratamientos de 15 min, 20°C, además de la disgregación de la micela comienza a aparecer otro fenómeno, la agregación (Regnault y col., 2004). Ésta se debe a que estas presiones intermedias (entre 250 y 300 MPa) favorecen las interacciones hidrofóbicas respecto a la solvatación de los residuos hidrofóbicos expuestos. La asociación se vería promovida, además, por la neutralización de las cargas negativas de las caseínas que producen los iones calcio disueltos (Huppertz y De Kruif, 2006; Huppertz y col., 2006b). Por esta razón, algunos autores han observado que el tamaño de la micela de caseína puede aumentar a 250 MPa, aunque este hecho depende de varios factores, como la duración del tratamiento, el pH y la temperatura, como se explica más adelante (Huppertz y col., 2004a).

Los tratamientos a presión  $>300$  MPa reducen el tamaño de la micela de caseína, que alcanza, a 400 MPa, aproximadamente la mitad del tamaño inicial (Gaucheron y col., 1997; Needs y col., 2000b; Huppertz y col., 2004a, d, e), y no varía con el aumento de presión (Anema y col., 2005a, Huppertz y col., 2004a), ni con posteriores presurizaciones (Huppertz y col., 2004a). Estos cambios ocurren rápidamente y se acompañan de un importante aumento en el nivel de caseínas de la fase sérica, que es máximo a presiones de 250-350 MPa (López-Fandiño y col., 1998; Huppertz y col., 2004c). Las caseínas son liberadas durante la disgregación micelar en el orden:  $\kappa$ -,  $\beta$ - $\rightarrow$   $\alpha_{S1}$ - $\rightarrow$   $\alpha_{S2}$ -CN, el cual coincide con el número de residuos por molécula capaces de unir CCP y, por tanto, de contribuir al mantenimiento de la estructura micelar (López-Fandiño y col., 1998; Anema y col., 2005a). Medidas *in situ* han demostrado que la máxima solubilización del CCP tiene lugar a 400 MPa, lo que coincide con una disrupción micelar completa e irreversible (Huppertz y De Kruif, 2007a). Por otro lado, el volumen de las micelas o subunidades resultantes es mayor, aproximadamente un 12% superior que las micelas nativas (Regnault y col., 2004).

Dependiendo de la duración del tratamiento, los efectos de la alta presión en la micela de caseína pueden variar. Los tratamientos a 250 MPa durante tiempos  $\geq 5$  min producen la reducción del tamaño de la micela, aunque, posteriormente, éste va aumentando a medida que se prolonga el tratamiento hasta los 40 min, momento en el que se alcanza el máximo crecimiento (un 30% respecto al tamaño de la micela sin tratar), siendo a los 20 min cuando el tamaño de la micela supera a la micela nativa. A presiones superiores (400 MPa) y tras sólo 1 seg de tratamiento, el tamaño de la micela se reduce (40% a 400 MPa) y tratamientos más largos no reducen más el tamaño micelar (Huppertz y col., 2004a).

Existen muy pocos estudios que muestren el efecto de la velocidad de despresurización en la micela de caseína, pero podría tratarse un factor importante, ya que durante esta fase comenzarían a restablecerse interacciones electrostáticas e hidrofóbicas destruidas durante el tratamiento con alta presión, originando la reasociación de las caseínas. Se ha observado que la despresurización rápida de la leche (600 y 200 MPa/min) produce micelas de caseína de menor tamaño y mayor volumen hidrodinámico que las obtenidas tras una despresurización lenta (20 MPa/min) o sin tratar (Merel y col., 2007).

Al combinar presión y temperatura también se produce disgregación micelar, pero el tamaño aumenta progresivamente a medida que aumenta la temperatura de presurización (20-

60°C), presumiblemente porque ésta limite la ruptura de las interacciones hidrofóbicas o promueva la agregación de las proteínas tras la descompresión (García-Risco y col., 2000; Huppertz y col., 2004a). En concreto, en leche presurizada a 400 MPa durante 15 min el tamaño medio, medido por microscopía electrónica de transmisión, pasa de 38 a 135 nm al cambiar la temperatura de presurización de 25 a 60°C (García-Risco y col., 2000). Sin embargo, a temperaturas inferiores (9°C) y tras tratamientos a presiones  $\leq 300$  MPa no se observa agregación, sino simplemente disgregación micelar, que aumenta a medida que sube la presión, disminuyendo la turbidez de la leche (Regnault y col., 2004), y que conduce a un tamaño micelar notablemente inferior al de la micela sin tratar (Huppertz y col., 2004). La desintegración micelar inducida a bajas temperaturas, probablemente se debe a un debilitamiento sinérgico de las interacciones hidrofóbicas (Regnault y col., 2004; Huppertz y col., 2004a).

El pH también juega un papel importante en los cambios de tamaño de la micela de caseína producidos por la alta presión. La aplicación de 250 MPa durante 30 min a leche desnatada produce un aumento del tamaño de la micela (25 %) cuando el pH de la leche es de 6.7 y 7.0, disminuyendo posteriormente a medida que se incrementa el nivel de presión. Sin embargo, a pHs de 6.5 no se produce este efecto, sino que el tamaño disminuye. Además, la disminución del tamaño de la micela que se produce a presiones  $\geq 300$  MPa es mayor a pHs más bajos (6.7 frente a 7.0) (Huppertz y col., 2004a). El pH bajo favorece la solubilización del CCP y, por tanto, la destrucción de la estructura coloidal y el incremento en el contenido de caseínas no sedimentables inducida por las altas presiones (Arias y col., 2000). Por el contrario, a pH neutro o alcalino, la solubilización de CCP es limitada y ayuda a mantener la estructura coloidal (Anema y col., 1997; Huppertz y col., 2004a), aunque la cantidad relativa de todas las caseínas en la fracción del suero aumenta, probablemente a causa del aumento de la carga negativa y la repulsión electrostática (Arias y col., 2000).

Todos los estudios presentados se han realizado en equipos de laboratorio o a escala piloto, no existiendo actualmente evidencias del efecto que podría tener la presurización de leche en equipos industriales. Dado que el diseño de estos últimos, incluyendo los sistemas de liberación de la presión, termostatación etc., es diferente, no debe descartarse que pudiera influir en el tamaño y la composición de la micela de caseína resultante o en la desnaturalización de las proteínas séricas.

Algunos estudios sugieren que las proteínas de suero, desnaturalizadas por la presión, podrían estar implicadas en los procesos de agregación proteica producidos por los tratamientos con altas presiones. En concreto, la  $\beta$ -Lg, al interaccionar con las micelas de caseína mediante su unión con la  $\kappa$ -CN (Schrader y Buchheim, 1998; Huppertz y col., 2004a), podría proteger a la micela de la disgregación (Kelly y col., 2002) o contribuir a su agregación (Huppertz y col., 2004d). Sin embargo, estudios posteriores con sistemas de los cuales se habían eliminado las proteínas de suero, mostraron que éstas influyen muy poco en los cambios del tamaño de la micela inducidos por la presión, por lo que parece más probable que el incremento de tamaño sea debido exclusivamente a la formación agregados caseínicos (Anema y col., 2005a; Huppertz y col., 2007b). En concreto, Huppertz y col. (2007b) observaron que tratamientos de presión de duración corta ( $\leq 10$  min), aplicados a suspensiones de caseínas micelares reconstituidas con adicción de proteínas de suero, producen micelas de mayor tamaño que las obtenidas en el mismo sistema en ausencia de proteínas de suero. Sin embargo, tras tratamientos de duración larga se elimina esta diferencia, lo cual apunta a una influencia menor de las proteínas de suero en los cambios de la micela de caseína inducidos por la alta presión.

La reversibilidad de los cambios micelares producidos por los tratamientos de alta presión también ha sido objeto de estudio. Hasta 250 MPa, la mayoría de los cambios son reversibles, sin embargo, a presiones superiores, su reversión depende del tiempo y la temperatura de almacenamiento. Huppertz y col. (2004c) observaron que el aumento en el tamaño micelar medio observado en leche tratada a 250 MPa, disminuye durante el almacenamiento a 20°C durante 24-48 h. En cambio, las partículas de pequeño tamaño que se producen a mayores presiones son estables durante el mantenimiento posterior, probablemente porque se necesite una estructura mínima que ejerza de *núcleo* para la agregación, lo que se ve seriamente comprometido cuando la solubilización del CCP es muy importante o completa (Huppertz y col., 2004c). En general, no se ha descrito reversibilidad de los cambios producidos por las altas presiones durante almacenamientos a 5°C

Gerhardt y col. (2006) explican en detalle como serían los cambios en la estructura micelar producidos por la alta presión, a partir de sus estudios de espectroscopía de correlación de fotones (PCS) *in situ* y microscopía de fuerza atómica (AFM) (Figura 9). A presiones entre 100-250 MPa la micela se disgrega en mini-micelas, algunas de las cuales, tienen un alto contenido en CCP, lo que les permite asociarse con otros fragmentos menos



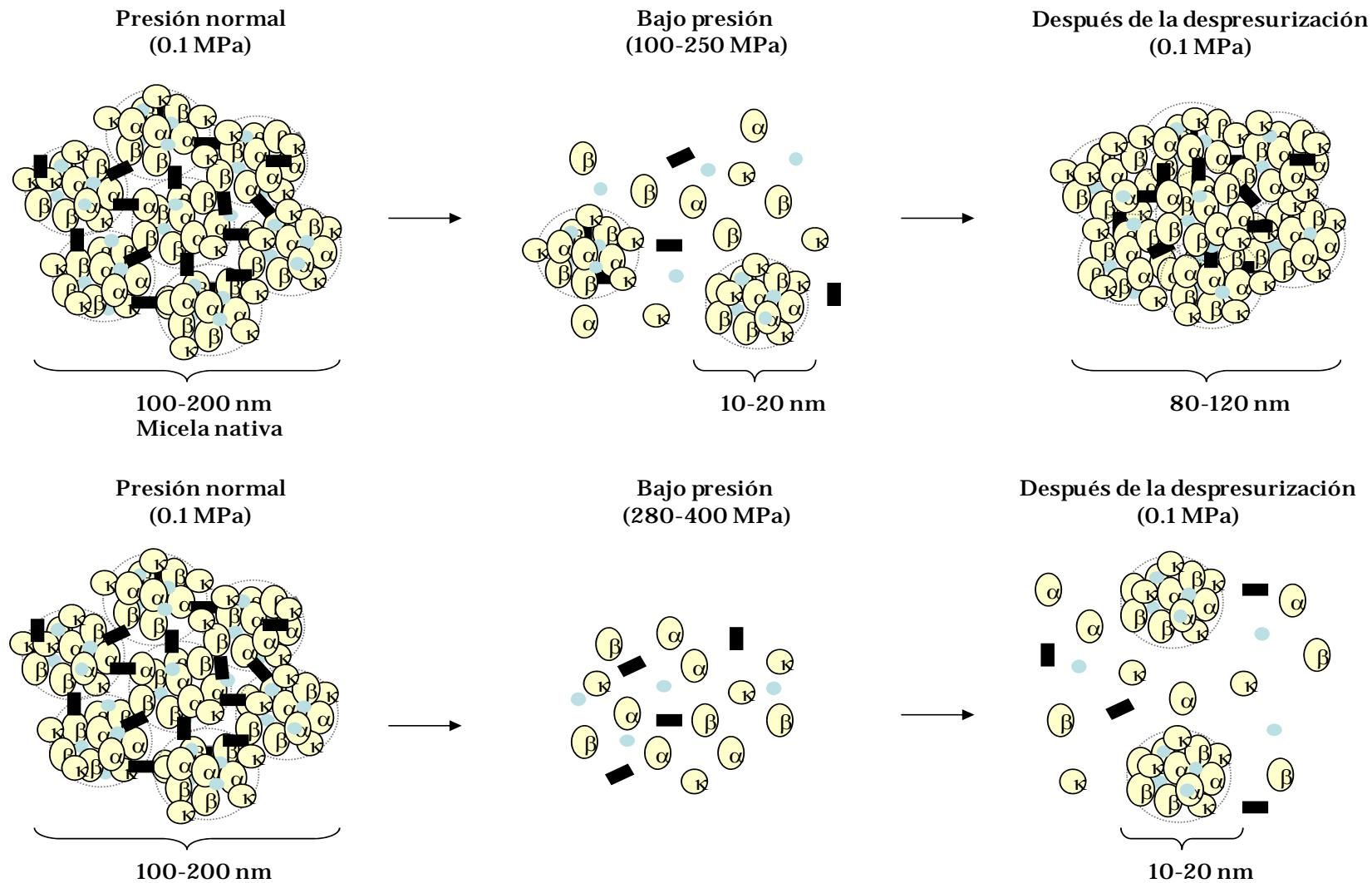
ricos en CCP formando una nueva micela al cesar la presión. Esta nueva micela sería algo más pequeña, más compacta y homogénea que la nativa, y en ella, las partículas ricas en CCP, se encontrarían en el interior, mientras que las partículas hidrofóbicas, con menor contenido en fosfato cálcico, se concentrarían en la superficie. Por lo tanto, el núcleo de esta micela estaría estabilizado por uniones con el CCP, mientras que la superficie estaría dominada por uniones hidrofóbicas entre las caseínas. Sin embargo, a presiones superiores a 280 MPa, las micelas se disocian completamente en monómeros unitarios por la reducción de interacciones electrostáticas y no-polares y aumenta la concentración de calcio libre y fosfato. Estos monómeros se pueden reasociar, ya que el alto nivel de calcio libre induce agregación, pero no se producirían micelas similares a la nativa, ni en tamaño ni en estructura, ya que la disociación del CCP, necesario para formar la micela, a estas presiones es irreversible.

#### **1.2.1.4. Aplicaciones tecnológicas de los tratamientos con alta presión**

En los apartados anteriores se ha explicado que la alta presión reduce el tamaño de la micela de caseína y produce disgregación micelar, desnaturaliza la estructura de las proteínas de suero y altera el equilibrio mineral de la leche, en mayor o menor grado, dependiendo del nivel de presión, el tiempo de tratamiento y el pH, entre otros factores. Estos cambios que se producen en las proteínas mejoran sus propiedades funcionales y su aptitud tecnológica para ciertos procesos, como la coagulación enzimática y ácida, por lo que pueden utilizarse en la industria alimentaria para elaborar productos como quesos y yogures.

- Coagulación enzimática y fabricación de quesos

La coagulación enzimática se basa en dos procesos interrelacionados, por un lado en la hidrólisis específica de la  $\kappa$ -CN produciendo para- $\kappa$ -CN y caseinmacropéptido y, por otro, en la agregación de las micelas de caseína modificadas enzimáticamente (López-Fandiño, 2006a). Se ha observado que el tiempo de coagulación disminuye a presiones de hasta 200-250 MPa, aumentando posteriormente, a medida que aumenta la presión aplicada, hasta alcanzar tiempos similares a 400 MPa a los de la leche cruda, o superiores (15% más rápido a 600 MPa) (López-Fandiño y col., 1996; Needs y col., 2000b; Zobrist y col., 2005).



**Figura 9.** Representación esquemática de los cambios estructurales inducidos por la presión basado en el modelo de Walstra (1999) relacionado con los modelos micelares descritos antes (adaptado de Gebhardt y col., 2006).

La alta presión acelera la coagulación enzimática de la leche debido a varios factores. Por un lado, la disgregación de la micela libera caseínas a la fase soluble de la leche, entre ellas la  $\kappa$ -CN, que es muy importante en la estabilidad de la micela. Se reduce así la carga negativa y la repulsión electrostática en la micela. Además, la reducción de la capa hidrofílica que recubre las micelas promueve las interacciones hidrofóbicas y la agregación proteica (Johnston y col., 2002). Sin embargo, estos efectos se ven contrarrestados por la desnaturalización de la  $\beta$ -Lg inducida por la presión. Esta proteína comienza a desnaturalizarse a 200 MPa, su estructura comienza a desplegarse y el grupo sulfidrilo libre, antes oculto en su estructura, se une a proteínas como la  $\kappa$ -CN (Patel y col., 2006), reduciendo de esta manera la susceptibilidad de la  $\kappa$ -CN a hidrolizarse por la quimosina (López-Fandiño y col., 1997). Además, la unión de ambas proteínas aumenta la repulsión electrostática, e interfiere en la agregación micelar a presiones superiores a 250 MPa (López-Fandiño, 2006b). Zobrist y col. (2005) observaron que el tiempo de coagulación de la leche no aumentó cuando se presurizó a 400 y 600 MPa sin que hubiera proteínas de suero, o conteniendo  $\text{KIO}_3$ , que impide la unión de la  $\beta$ -Lg a la micela de caseína.

Además de acortar el tiempo de coagulación, dependiendo del balance entre la disgregación micelar y la desnaturalización de las proteínas de suero, los tratamientos con alta presión dan lugar a cuajadas más firmes, hecho que se ha asociado a la disminución del tamaño micelar (López-Fandiño y col., 1996). Las cuajadas con mayor firmeza se obtuvieron en leches pasteurizadas a 65°C durante 30 min con posterior tratamiento a 400 MPa, 15 min (Molina y col., 2000).

En la fabricación de queso es también importante el rendimiento de la cuajada, en el que influye la cantidad de proteínas desnaturalizadas asociadas a las caseínas y la cantidad de agua retenida en la cuajada (Huppertz y col., 2004b). En la leche cruda, los tratamientos con alta presión a 100-400 MPa aumentan el contenido en proteínas y la humedad de la cuajada y mejoran su firmeza, mientras que se acelera o mantiene el tiempo de coagulación (López-Fandiño y col., 1996). Ya se ha mencionado que la unión de la  $\beta$ -Lg a las caseínas produce un aumento de la carga neta negativa de la micela, y esto puede llevar asociado un aumento de la solvatación (Imafidon and Farkye, 1996) y una reducción de la sinéresis (Smith and McMahon, 1996). Además, la solvatación también aumenta a presiones entre 100 y 600 MPa debido a la formación de submicelas o agregados de menor tamaño (Gaucheron y col., 1997; Huppertz y col., 2004c). En cualquier caso, el aumento del rendimiento va estrechamente

ligado a la desnaturalización de la  $\beta$ -Lg: a presiones  $\leq 250$  MPa, el rendimiento de la cuajada no varía (Huppertz y col., 2004f), mientras que tras tratamientos a presiones superiores, 300 y 400 MPa (30 min, 20-25°C), se observaron aumentos del rendimiento del 14% y del 20% respectivamente (López-Fandiño y col., 1996), que llegan a un 25% en leches presurizadas a 600-800 MPa (Huppertz y col., 2004f).

Algunos autores han estudiado la estructura de quesos elaborados a partir de leche presurizada. Los quesos Cheddar elaborados a partir de leche presurizada a 586 MPa (3 ciclos de 1 min) mostraron un contenido de humedad y un rendimiento mayor que los mismos hechos con leche cruda o pasteurizada, aunque la textura fue pastosa y débil (Drake y col., 1997). En quesos con bajo contenido en grasa fabricados a partir de leche pasteurizada (65°C, 30 min) y posteriormente presurizada (400 MPa, 22°C, 15 min) también se observó un aumento del rendimiento frente a los elaborados con leche pasteurizada, al igual que una proteólisis más rápida de las caseínas, lo que contribuyó a un desarrollo más rápido de la textura, el aroma y el sabor (Molina y col., 2000). Además, el queso Fresco elaborado a partir de leche presurizada (400 MPa, 20 min, 20°C) fue más húmedo, menos firme, menos quebradizo y más pegajoso (Sandra y col., 2004).

- Coagulación ácida y fabricación de yogur

Los tratamientos con alta presión también favorecen la coagulación ácida. Factores como la desintegración micelar, la pérdida de la estabilidad electrostática de la micela de caseína cerca de pH 5.3 y la mayor frecuencia de colisión de las partículas influyen en la calidad del coágulo formado por acidificación (Banon y Hardy, 1992; Schwertfeger y Buchheim, 1998; Huppertz y col., 2002). En leches reconstituidas tratadas con presión, la gelificación inducida por la acidificación se produce a pHs superiores que la producida en leches no presurizadas, debido a los cambios inducidos por la presión en la capacidad tamponadora (Desobry-Banon y col., 1994). Además, en leche bovina presurizada, la acidificación producida por la inoculación con bacterias ácido-lácticas se produce más rápidamente, probablemente debido a que la rotura de la micela produce un aumento del nitrógeno accesible a la bacteria (Huppertz y col., 2004g).

Algunos estudios demostraron que las propiedades de los geles formados por acidificación mejoran al presurizar la leche. Por ejemplo, Johnston y col. (1993, 2002)

obtuvieron geles más rígidos, más fuertes y con mayor resistencia a la sinéresis, lo cual se correlacionó con un aumento en la hidratación y en la densidad de la malla de proteína. La agregación de pequeñas partículas micelares daría lugar a agregados compactos de menor tamaño cuando se alcanza el punto isoelectrico. Además, el hecho de que en su superficie se encuentre  $\beta$ -lg desnaturalizada contribuye a la firmeza del gel y a la resistencia a la sinéresis (Harte y col., 2002).

Se ha observado que la firmeza de los yogures elaborados a partir de leche presurizada aumenta a medida que aumenta la presión (Needs y col., 2000). Los yogures elaborados a partir de leche presurizada a 55°C, presentan una gran firmeza sin rotura micelar aparente, lo cual pone de manifiesto la importancia de la desnaturalización de las proteínas de suero en este proceso (Ferragut y col., 2000). Además, Harte y col. (2003) observaron que el uso de un tratamiento térmico (85°C, 30 min), antes o después de los tratamientos de alta presión, que produce una amplia desnaturalización de las proteínas de suero, mejora las propiedades reológicas y reduce la sinéresis. A este respecto debe indicarse que algunos estudios han puesto de manifiesto que la firmeza optima se obtiene combinando la desnaturalización de las proteínas de suero con una alta concentración de caseínas micelares disgregadas (Capellas y Needs 2003).

- *Gelificación de la leche por la alta presión*

Otro de los efectos que producen las altas presiones en la leche es la gelificación de leche concentrada (66-114 g/ kg de proteína), en concreto, a presiones de 200 y 400 MPa. La disminución del pH hacia 5.9 y el aumento del contenido proteico contribuyen a la formación de geles de mayor firmeza (Famelart y col., 1998). Las propiedades relativas a la viscosidad, viscoelasticidad y textura de los geles fabricados a partir de leche concentrada dependen del nivel de presión, siendo la disociación micelar un requisito indispensable en la formación del gel, mientras que la agregación de las proteínas del suero tiene un papel secundario (Keenan y col., 2001). De hecho, la firmeza de los geles formados a partir de caseínas depende de la velocidad de descompresión, a diferencia de los geles formados por proteínas de suero (Fertch y col., 2003). La despresurización rápida produce geles más firmes, con una microestructura más fina que los elaborados tras despresurizaciones lentas, lo que fue atribuido a que, una vez que se produce la disociación de la micela de caseína durante la fase de mantenimiento de la presión, una despresurización lenta favorecería el desarrollo de hiperestructuras caseínicas, al

reformarse los puentes de calcio y las interacciones hidrofóbicas, lo que dificultaría una gelificación homogénea (Fertsch y col., 2003). Sin embargo, Merel-Rausch y col. (2007), que también encontraron geles de mayor firmeza a velocidades rápidas de liberación de la presión, lo correlacionaron con la formación de grandes estructuras flexibles, construidas a partir de micelas de caseína de menor tamaño.

## **2. OBJETIVO GENERAL Y** **PLAN DE TRABAJO**





En la actualidad, la industria alimentaria utiliza frecuentemente proteínas lácteas como ingredientes para productos alimentarios, por su valor nutricional y, sobre todo, por sus propiedades funcionales. Entre otros muchos productos, estas proteínas son utilizadas para la elaboración de fórmulas infantiles. Aunque el mejor alimento para el recién nacido es la leche materna, no siempre es posible la lactancia y es necesario recurrir a fórmulas infantiles que sustituyan a la leche humana.

Según el Codex Alimentarius, las fórmulas infantiles deben promover el normal crecimiento y desarrollo del niño y satisfacer, por sí solas, sus requerimientos nutricionales. El objetivo principal de los fabricantes no es obtener una fórmula que reproduzca fielmente la composición de la leche humana, sino que, más bien, imite los efectos funcionales de la leche materna. El conocimiento cada vez más exhaustivo de la importancia de algunos de sus componentes, como citoquinas o factores de crecimiento, un adecuado balance de ácidos grasos poliinsaturados (n-3/n-6) o la presencia de determinadas especies de bacterias probióticas, a las que los oligosacáridos humanos (de los que se conocen más de 100 estructuras distintas) sirven como sustratos, ha conllevado a importantes avances en el desarrollo de fórmulas infantiles mejoradas. También es sabido que muchas de las propiedades beneficiosas de la leche humana se deben a la fracción de proteínas que, además de proporcionar un aporte adecuado de nutrientes, contribuye a la defensa frente a infecciones y facilita el óptimo desarrollo de funciones biológicas esenciales para el recién nacido. Sin embargo, los requerimientos proteicos precisos son un tema controvertido (Lönnnerdal, 2010).

Algunos autores señalan la importancia de una ingesta adecuada de proteínas durante los primeros meses de vida, sobre todo, de la relación entre proteínas de suero/caseínas. La presencia de caseínas en la leche humana es una de las menores comparada con la de otros mamíferos. Así, mientras la leche bovina contiene unos 25 g/L, la leche humana contiene sólo 4.6 g/L (Ginger and Grigor, 1999). Un contenido bajo de proteínas y la predominancia de proteínas de suero, que caracterizan a la leche humana, facilitaría el proceso de digestión e incluso podría inducir una mayor colonización del intestino por bacterias probióticas. Por otra parte, una ganancia rápida de peso durante la infancia se asocia con un mayor riesgo de obesidad. De hecho, comparados con los niños alimentados con leche materna, los alimentados con fórmulas ganan más peso durante la infancia. Esto se explica por una mayor ingesta de sustratos metabolizables y, en particular, de proteínas: la ingesta de proteínas por

kg de peso corporal es del 55-80% mayor en los niños alimentados con fórmulas respecto a los alimentados con leche materna (Koletko y col., 2009).

Durante la manufactura de las fórmulas infantiles, la aplicación de tratamientos térmicos es imprescindible para garantizar su inocuidad. Sin embargo los procesos convencionales afectan negativamente sus propiedades químicas y la biodisponibilidad de nutrientes, incluyendo degradación de vitamina C, peroxidación de lípidos, formación de agregados de lípidos y proteínas y formación de productos de la reacción de Maillard, que disminuyen la disponibilidad de la lisina y tienen menor capacidad de unión a magnesio, cobre, calcio y zinc, inhibiendo su absorción (Sarriá y col., 2001).

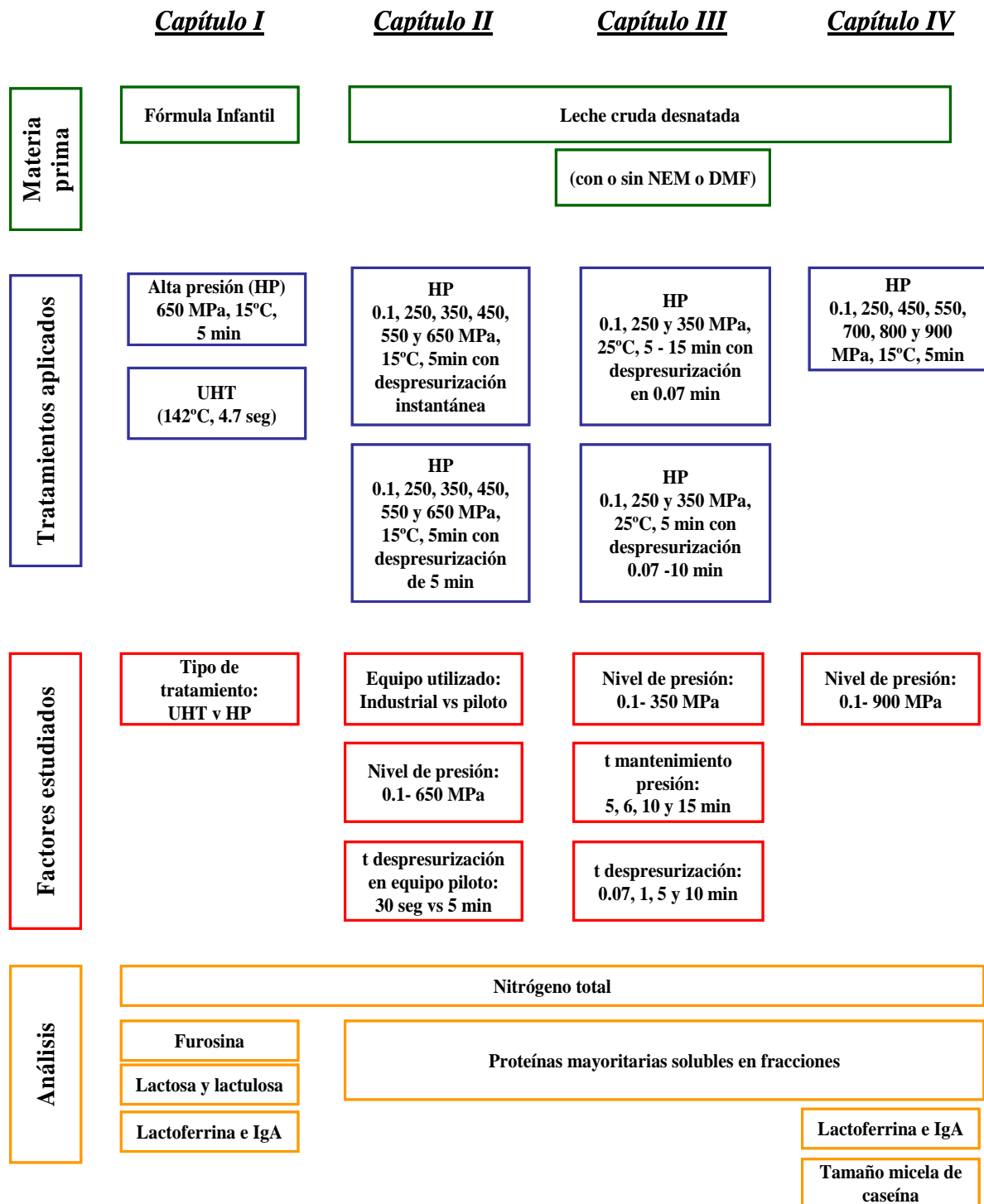
En los últimos 30 años se han desarrollado enormemente nuevas tecnologías de procesado y conservación de alimentos, las llamadas tecnologías emergentes, si bien la alta presión hidrostática es la única tecnología emergente que ha dado lugar a productos comerciales, pudiéndose encontrar en los lineales de los supermercados una considerable variedad de alimentos presurizados. La mayoría de las aplicaciones de la alta presión se basan en su capacidad de destruir microorganismos sin afectar negativamente a las características nutricionales de los alimentos. Pero, además, los tratamientos con alta presión pueden modificar la estructura cuaternaria, terciaria y, en menor medida secundaria, de las proteínas, conduciendo a propiedades funcionales únicas o muy difíciles de conseguir con otros procesos. Así, como consecuencia de la desnaturalización de las proteínas de suero y de la ruptura micelar, se forman nuevas estructuras proteicas, lo que, además de mejorar la aptitud tecnológica de la leche para ciertos fines, podría permitir la obtención de fracciones con de interés nutricional. En cualquier caso, la intensidad, la duración y la temperatura de los tratamientos, así como, el pH y la concentración de proteína influyen en los cambios originados por las altas presiones. Actualmente, el efecto de la mayoría de estas variables se conoce bien, pero rara vez se ha estudiado la influencia de parámetros como el tipo de equipo de alta presión, la velocidad de despresurización o el empleo de presiones muy elevadas, superiores a 600 MPa.

Esta tesis doctoral profundiza en el estudio de la desnaturalización de las proteínas de suero de la leche, la desintegración micelar de las caseínas y en los cambios en la distribución de estas proteínas que origina el tratamiento con altas presiones hidrostáticas. El objetivo era explorar el potencial de las altas presiones para mantener la calidad nutritiva de las proteínas

de la leche y obtener fracciones lácteas de diferente composición y concentración de proteínas con aplicabilidad en la elaboración de nuevas formulas infantiles. Para desarrollar este objetivo, nos centramos en los siguientes objetivos parciales:

- Estudio del efecto de las altas presiones hidrostáticas en las propiedades nutricionales de fórmulas infantiles líquidas.
- Estudio del efecto del tipo de equipo de alta presión y del escalado en la distribución proteica de diferentes fracciones lácteas.
- Estudio del efecto de la velocidad de despresurización en la distribución proteica de diferentes fracciones lácteas.
- Estudio del efecto de presiones muy elevadas, entre 700, 800 y 900 MPa, aplicadas a diferentes fracciones lácteas, sobre su distribución proteica.

Cada uno de los objetivos expuestos constituye un capítulo de la Tesis en el que se discute la influencia de las distintas variables del tratamiento de alta presión en los cambios encontrados.



**Figura 10.** Esquema del plan de trabajo desarrollado.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



### **3.1. Preparación de las muestras y tratamiento aplicado**

El procedimiento llevado a cabo para preparar las muestras (leches y fórmulas infantiles), los tratamientos de presión o UHT aplicados y los equipos de alta presión utilizados se explican con detalle en el apartado de Materiales y Métodos de cada capítulo.

### **3.2. Obtención de fracciones proteicas**

Una vez tratadas las muestras, ya sean leche desnatada, leche desnatada con o sin NEM o DMF, sobrenadantes de ultracentrifugación o fórmulas infantiles, se procedió al fraccionamiento de las mismas como se indica a continuación:

- Fracción soluble de la ultracentrifugación a 100 000 x g, a 20 °C durante 1 h. La separación de las proteínas mediante esta técnica se basa en la diferente velocidad de sedimentación de las moléculas en función de su peso molecular o del tamaño medio de un conjunto de partículas. El sobrenadante obtenido se filtró a través de papel de filtro Whatman n° 41.
- Fracción soluble a pH 4.6 se obtuvieron ajustando el pH de las muestras a 4.6 con HCl 2N, pH en el cual precipitan las caseínas. Las muestras se dejaron reposar durante 20 minutos, y se centrifugaron a 4 000 x g, 20 min, 5 °C. La fracción soluble se filtró a través de papel de filtro Whatman n° 40.
- Fracción soluble de la precipitación con ácido tricloroacético al 4% (concentración final). Las muestras se mezclaron con un volumen idéntico de ácido tricloroacético al 8% (v/v), se mantuvieron en reposo durante 1 h y se filtraron por un filtro Whatman n° 40. Este fraccionamiento sólo se realizó en las fórmulas infantiles (capítulo I).

### **3.3. Análisis de las muestras control y de las fracciones proteicas**

#### **3.3.1. Determinación del contenido en nitrógeno**

Se empleó el método Kjeldahl para determinar el contenido en nitrógeno total siguiendo el método prescrito en la Norma IDF (FIL-IDF, 1993). El contenido de proteínas se calculó multiplicando dicho contenido por 6.38. Las muestras se digirieron en un digestor DK 20 (Velp Scientifica Srl., Usmate, Italy) y se destilaron en una unidad de destilación UDK 142 (Velp Scientifica Srl.).

#### **3.3.2. PAGE-SDS**

Las leches, las fórmulas infantiles y las fracciones obtenidas según los distintos procedimientos de ambas se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en presencia de agentes desnaturalizantes (SDS) y en condiciones reductoras (2- $\beta$ -mercaptoetanol). Las leches y fórmulas infantiles se diluyeron 1:9 y las fracciones solubles 1:3 en tampón de la muestra, consistente en 2.5% de SDS, 1 mM EDTA (ácido dinitrotetraacético) y 5% de 2- $\beta$ -mercaptoetanol en 10 mM de tampón Tris(hidroximetil)amino metano pH 8. En los geles se incluyó una mezcla de proteínas estándar compuesta por fosforilasa B (97 kDa), BSA (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (21.5 kDa) y  $\alpha$ -La (14.4 kDa) (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). El desarrollo de la electroforesis se llevó a cabo en un equipo automatizado (PhastSystem, Pharmacia), dotado de una unidad de separación y una de tinción. Se utilizaron geles Homogeneous 20 y tiras de tampón (PhastGel SDS Strips) comerciales (GE Healthcare). Se siguieron las condiciones electroforéticas indicadas en el manual del equipo (Pharmacia, nota de aplicación nº 111, 1987), mostradas en la Tabla 2. Los geles se tiñeron con azul de coomasie R-350 siguiendo las condiciones que se describen en el manual de instrucciones (Pharmacia, notas de aplicación nº 200 y nº 210 de 1987, respectivamente).



**Tabla 2.** Condiciones eléctricas de la separación en PAGE-SDS en PhastSystem

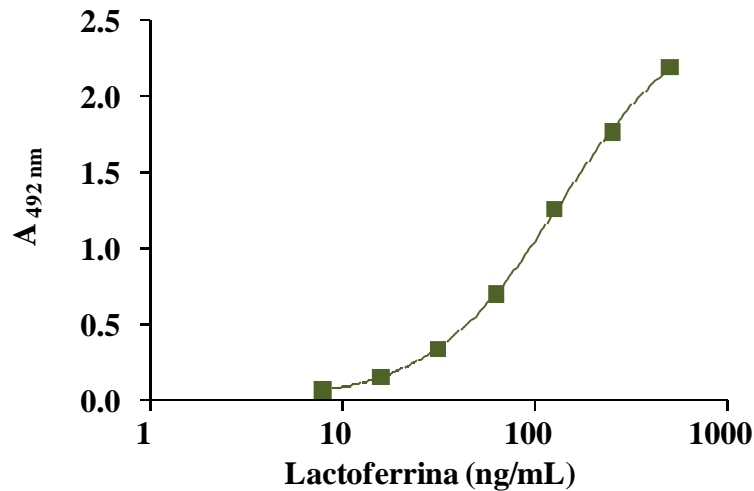
	<b>Voltaje</b> (V)	<b>Intensidad</b> (mA)	<b>Potencia</b> (W)	<b>T<sup>a</sup></b> (°C)	<b>Voltio/h</b>
<b>Preelectroforesis</b>	250	10	3	15	1
<b>Aplicación de la muestra</b>	250	1	3	15	1
<b>Electroforesis</b>	300	10	3	15	125

### 3.3.3. Electroforesis Capilar

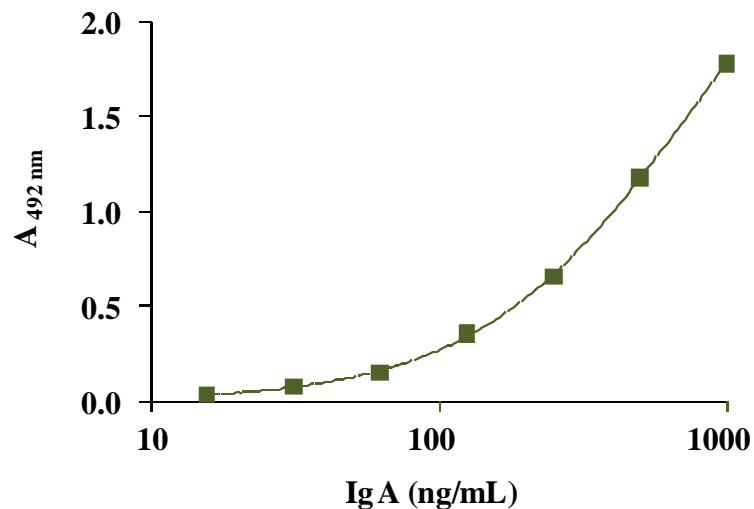
El contenido en las proteínas individuales mayoritarias de las leches, fórmulas infantiles y de las fracciones se determinó por electroforesis capilar (EC) en un sistema Beckman p/ACE 2050, siguiendo el método de Recio y col., (1997). Se utilizó un capilar de sílice recubierto con TSP (BGB Analytik Vertrieb, Schlossboeckelheim, Alemania) de 57 cm de longitud total (50 cm de longitud efectiva) y 50 µm de diámetro interno insertado en un cartucho con una ventana de 100 x 800 µm. La separación se realizó a 45°C, aplicando un gradiente lineal de voltaje de 0 a 25 kV en 3 min, seguido de un voltaje constante de 25 kV durante 47 minutos. El tampón de separación, pH 3, estaba compuesto por 6 mM de urea, 0.05 % (p/v) de metilhidroxiethylcelulosa (MHEC), 20 mM de citrato trisódico dihidratado y 0.32 de ácido cítrico. Para el tampón de la muestra, de pH 8.6, se trató una solución de 10 M de urea y de 0.083 % (p/v) de MHEC, con 2.5 % (p/v) de resina desionizante, agitando hasta que su conductividad fue inferior a 2 S/cm y se filtró a través de papel Whatman 41. Una vez desionizada se añadió 167 mM de Tris(hidroximetil)aminometano, 67 mM de etilendiaminotetraacetato sódico (EDTA) y 17 mM de DL-ditiotreitol (DTT). Las muestras se diluyeron 1:2.5 con tampón de la muestra. Antes de cada análisis, el capilar se lavó con tampón de separación en sentido inverso (del cátodo al ánodo) durante 6 minutos. Las muestras se inyectaron en el ánodo durante 60 segundos a una presión de nitrógeno de 0.5 psi. La detección se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 214 nm. La identificación individual de las proteínas lácteas se realizó siguiendo a Recio y col. (1997).

### 3.3.4. ELISA tipo sandwich

La cuantificación de lactoferrina (Lf) e inmunoglobulina A secretora (IgA) se realizó mediante esta técnica inmunológica, empleando kits comerciales de cuantificación de Lf e IgA bovina de Bethyl Laboratories. Inc. (Montgomery, USA). En primer lugar se añadieron 100  $\mu$ L del anticuerpo anti-lactoferrina bovina (anti-LF) o anti-IgA bovina (anti-IgA) a una placa multipocillos (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA ) y se incubó durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la placa se lavó 3 veces con un tampón de lavado (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05 % Tween 20, pH 8) y se bloquearon los pocillos durante 30 min con 200  $\mu$ L de tampón de bloqueo (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 1% BSA, pH 8). Nuevamente, se volvió a lavar la placa 3 veces y, a continuación, se añadieron 100  $\mu$ L de las leches y fórmulas infantiles controles y presurizadas y de las fracciones de leche. Tanto las leches como sus fracciones se diluyeron 1:2000 y 1:1000 dependiendo del tratamiento de presión aplicado mientras que las fórmulas infantiles se testaron sin diluir. Además, también se añadieron disoluciones de Lf en 50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 1% BSA y 0.05% Tween 20 a pH 8, en el intervalo de 500-7.8 ng/mL, o de IgA en el intervalo de 1000-15.6 ng/mL, con el objetivo de elaborar una recta patrón. Tras 60 min de incubación a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron 5 veces con el tampón de lavado y se le adicionaron 100  $\mu$ L del anticuerpo anti-LF o anti-IgA unido a peroxidasa de rábano (HRP) (dilución 1:50000 en 50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8), incubándose 1 hora. A continuación, se lavó nuevamente 5 veces y se le adicionaron 100  $\mu$ L del sustrato de la enzima, ortofenilendiamina (OPD, Palex Medical SA, San Cugat del Vallés, España), y se dejó actuar durante 8 min en oscuridad, parándose la reacción mediante la adición de 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M. Se midió la absorbancia a 492 nm con un espectrofotómetro Multiskan Ascent (Thermo Fisher Scientific). La concentración de Lf en cada una de las muestras se determinó interpolando los valores de absorbancia en la curva patrón. La ecuación de la curva se obtuvo mediante el programa estadístico GraphPad Prism 4.0 y se ajustó a:  $y = ((A-D)/(1+(x/C)^B))+D$ , siendo: A= 0.01578; B= 1.403; C= 114.8; D= 2.304; R<sup>2</sup>= 0.9979 en el caso de la Lf (Figura 11) y A= - 0.0002165; B= 1.157; C= 755.2; D= 3.061; R<sup>2</sup>= 0.9986 para la IgA (Figura 12). Todas las muestras se ensayaron por duplicado.



**Figura 11.** Representación de la recta de calibrado de lactoferrina



**Figura 12.** Representación de la recta de calibrado de IgA

### 3.3.5. Medida del tamaño de la micela de caseína

Como medio de observación de la micela de caseína en la leche desnatada control y en las presurizadas de 250 a 900 MPa (capítulo IV) se utilizó la microscopía electrónica de transmisión siguiendo el método descrito por García-Risco y col. (2003). Para realizar el procedimiento fue preciso solidificar la leche. Se mezclaron en una placa Petri 5 mL de leche con 5 mL de agar estéril al 3 % (Scharlau, Barcelona, Spain) agitándose hasta quedar lo más homogéneo posible. Una vez solidificada la leche, se cortaron rectángulos de 1 cm x 0.5 cm x 10 mm<sup>3</sup> aproximadamente y se sumergieron en una solución de glutaraldehído al 2.5 %

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en PBS (4.5 % NaCl y 3.9 %  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) a pH 7, durante 3 horas a 4°C en oscuridad para la óptima fijación de las proteínas. Posteriormente, los rectángulos se lavaron 3 veces con PBS, pH 7 dejándose en dicha solución durante toda la noche a 4°C. El siguiente paso consistió en sumergir los rectángulos en una solución de tetróxido de osmio al 1 % (Ted Pella, Inc., Redding, CA, USA) durante 1 hora, impregnándose de esta forma con metal de alto peso molecular, incrementando su densidad electrónica. La eliminación del tetróxido de osmio se realizó mediante 2 lavados con agua Milli-Q, seguidos de lavados consecutivos con proporciones crecientes de acetona en agua (40, 60, 70, 90, 95 y 100%) para deshidratar la muestra. Finalmente, las muestras se fijaron en resina Epoxi Spurr (Taab Laboratory and Microscopy, Aldermaston, United Kingdom) mediante la adición de mezclas en proporciones crecientes de acetona-resina desde 2:1 hasta 100 % de resina. Tras cada una de estas adiciones se mantuvieron 1 hora a temperatura ambiente. Los rectángulos se pusieron en un molde de silicona cubriéndose de 100 % de resina, manteniéndose 72 h a 65°C, con lo que la resina se solidificó y fue fácilmente manipulable. Por último, se cortaron láminas de estas muestras con ultramicrotomo y se tiñeron con acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo Reynolds, ambos productos proporcionados por Taab Laboratory and Microscopy (Aldermaston, United Kingdom). Una vez teñidas se examinaron por el microscopio electrónico JEOL sem-1010 (JEOL Ltd., Tokio, Japan) operando a 80 kV.

La medida del tamaño de las micelas de caseína se realizó mediante el programa Measure IT (Olympus), midiéndose las caseínas incluidas en un rectángulo de 1.61x 2.16  $\mu\text{m}$  a partir de las fotografías realizadas con 40000 aumentos (2.89 x 3.6  $\mu\text{m}$ ). Se midieron aproximadamente 100 micelas de caseínas para cada tratamiento a partir de varias fotografías.

### **3.3.6. Determinación del contenido en lactosa y lactulosa**

El contenido en lactosa y lactulosa en las fórmulas infantiles (capítulo 1) se determinó por cromatografía de gases siguiendo el método descrito por Montilla y col. (2005). Esto requirió una extracción previa de los carbohidratos con metanol (1:9, v/v, fórmula infantil/metanol), con objeto de precipitar las proteínas y la grasa que pudieran interferir en las determinaciones. Tras 1 h de reposo, se recogieron 0.5 mL del sobrenadante, se mezclaron con 0.5 mL de  $\beta$ -fenil-glucósido (patrón interno) y se procedió a su secado por rotavapor.

Posteriormente, se realizó la derivatización de los carbohidratos, añadiendo 0.1 mL de DMF, con reposo de 1 h a 65°C, y 0.1 mL de N-trimetilsililimidazol (TMSI, Sigma-Aldrich), dejándolo reaccionar 30 min a 65°C. Finalmente, la reacción se interrumpió por frío y adición de 0.1 mL de hexano y 0.2 mL de agua y 1 µL de la fracción orgánica se utilizó para su análisis por cromatografía de gases. Para ello, se utilizó un cromatógrafo HP 6890 equipado con un detector de ionización de llama (FID) y con una columna de sílice fundida recubierta con metilfenilsilicona (OV17) de 25 m, 0.32 mm de diámetro interno y 0.5 µm de espesor de película. Se empleó N<sub>2</sub> como gas portador con un flujo inicial de 1.8 ml/min y se realizó la inyección con una relación de split de 1:40. El gradiente de temperaturas usado fue: 280°C en el inyector, 300 C en el detector, el horno se mantuvo a 235°C durante 10 min y, se programó un gradiente de 20°C/ min hasta 270°C que se mantuvo 5 min y de 20°C/ min hasta 290°C y se mantuvo 2 min. Para la cuantificación se empleó el método de calibración interna, utilizando β-fenil-glucósido como patrón.

### **3.3.7. Determinación del contenido en furosina**

El análisis de la furosina en las fórmulas infantiles (capítulo I) se realizó del siguiente modo: 2 mL de la fórmula se mezclaron con 6 mL de HCl 10.6 N en tubos pirex (10.2 x 2 cm) de hidrólisis. A continuación, se pasó una corriente de helio durante 1 min para crear una atmósfera inerte y, posteriormente, se realizó la hidrólisis a 110°C durante 23 horas. Una vez finalizada la hidrólisis, se filtró el hidrolizado a través de cartuchos C<sub>18</sub> (Sep-Pak Plus, Waters Corporation, Milford, Massachussets, USA), activados previamente con 5 ml de metanol y 10 ml de agua milli-Q. Por último, se pasaron 3 ml de HCl 3 N a través del cartucho C<sub>18</sub> para eluir la furosina retenida en el cartucho.

La determinación cuantitativa de la furosina se realizó por RP-HPLC empleando una columna C<sub>8</sub> específica para el análisis de furosina (Alltech, Lokeren, Bélgica) (250 mm x 4.6 mm d.i) (Resmini y col., 1990). El equipo utilizado estaba provisto de una bomba binaria modelo 250 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc, Waltham, Massachussets, USA), un inyector manual Rheodyne (modelo 9125), un horno (Kariba Instruments, Cardiff, USA) para termostatar la columna, un detector UV (LDC Analytical, SM 4000, Riviera Beach, FL, USA) y una interfase modelo 406 (Beckman). La adquisición y procesamiento de los datos se realizó utilizando el programa System Gold versión 711 (Beckman Instruments). Las

condiciones cromatográficas fueron las siguientes: temperatura de la columna, 35 °C; flujo, 1.2 mL/ min; volumen de inyección, 50 µl; fase móvil, eluyente A: 0.4% ácido acético grado HPLC (Sharlau Chemie, Barcelona, España) en agua milli-Q (v/v), eluyente B: 0.3% cloruro potásico en el eluyente A (p/v). La elución se realizó en gradiente lineal tal y como se muestra en la Tabla 3 y su detección se realizó midiendo la absorbancia a 280 nm.

El análisis cuantitativo se realizó por el método del patrón externo utilizando disoluciones de furosina patrón (Neosystem Laboratories, Strasbourg, Francia) entre 0.2 y 0.8 mg/L. Los datos se expresaron como mg de furosina/ 100 mg de proteína.

**Tabla 3.** Gradiente lineal empleado en la determinación de la furosina

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0	100	0
12.5	100	0
19.5	50	50
2	50	50
24	100	0
32	100	0

### 3.4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en cada estudio, procedentes de dos experimentos independientes, se expresaron como la media  $\pm$  la desviación standard o el 95% del intervalo de confianza y se analizaron mediante un análisis de la varianza de 1 ó 2 vías (ANOVA) utilizando el test de la menor diferencia significativa (LSD). El análisis de 2 vías se utilizó para determinar la existencia de interacción entre varios factores como por ejemplo el nivel de presión y el tipo de equipo de alta presión (capítulo 2). El programa estadístico utilizado para procesar los datos fue el Statgraphic Plus 5.0 para Windows (Statistical Graphics Corporation, Washington, USA, [www.statgraphics.com](http://www.statgraphics.com)).

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**





## **CAPÍTULO I**

**Estudio del efecto de las altas presiones sobre las propiedades  
nutricionales de las fórmulas infantiles líquidas**



## **I.1. Introducción**

La leche materna es el mejor alimento para el recién nacido, sin embargo, no siempre es posible su administración. Las fórmulas infantiles, diseñadas para reemplazar a esta leche, están elaboradas principalmente a base de proteínas lácteas bovinas, aunque se pueden completar hasta con 60 ingredientes, como aceites vegetales, vitaminas o minerales (Naispour y col., 2006; Thompson y Kharb, 2007), en cantidad necesaria para favorecer el crecimiento y desarrollo normal del niño, además de prevenir enfermedades (Bosch y col., 2008). La formulación de estas leches infantiles ha ido cambiando y mejorando a lo largo del tiempo, si bien el objetivo principal de los fabricantes no es obtener una fórmula que imite la composición exacta de la leche humana, ya que determinados ingredientes son muy difíciles de obtener, sino conseguir los efectos funcionales que produce la leche materna, por lo que se les adicionan, por ejemplo, probióticos o prebióticos. Además, algunos autores señalan la importancia de una ingesta adecuada de proteínas, sobre todo, de la relación entre caseínas/proteínas de suero, que es de 40/60 y 80/20 en la leche de humana y de vaca, respectivamente. La ingestión de un mayor contenido de proteínas de suero facilita el proceso de digestión (Riordan, 1998) e incluso podría favorecer la colonización del intestino por bacterias probióticas (Balmer y col., 1989).

Por otro lado, tanto las fórmulas lácteas como los ingredientes que se les añaden se someten a tratamientos térmicos con el fin de que el producto final sea seguro microbiológicamente y tenga una vida útil mayor. Además, el producto final normalmente pasa por torres de secado con el fin de obtener leches infantiles en polvo (Floris y col., 2007). Los tratamientos térmicos aplicados pueden ser relativamente suaves, como la pasteurización, que consiste en aplicar 71.7°C durante 5 seg, mientras que el tratamiento UHT, más severo, consiste en tratar el producto a 135°C, aproximadamente, durante unos segundos, e incluso, pueden darse tratamientos de esterilización (110°C, 10-30 min) (Pischetsrieder y Henle, 2012). Estos tratamientos térmicos pueden causar importantes daños en la composición de las fórmulas, como agregación de proteínas desnaturalizadas, degradación de vitamina C, peroxidación de lípidos, etc. Además, tanto en estos procesos, como durante el posterior almacenamiento de las fórmulas, se produce la reacción de Maillard, la unión de azúcares reductores como glucosa, lactosa y maltosa al grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina (Ferrer y col., 2003), que genera cambios de color, disminuye la calidad de las proteínas y su digestibilidad (Meade y col.,

2005; Dupont y col., 2010). Esta reacción es bastante frecuente en las fórmulas infantiles, ya que tienen un alto contenido en proteínas y lactosa (Pischetsrider y Henle, 2012).

Por ello, se intentan buscar nuevas técnicas de procesado de alimentos que minimicen los efectos secundarios producidos por los tratamientos térmicos. Dentro de las técnicas alternativas, la alta presión hidrostática es la más utilizada industrialmente, ya que permite obtener alimentos procesados con mejores cualidades sensoriales y nutricionales, sin embargo, su aplicación industrial en productos lácteos es aún bastante escasa, puesto que actualmente solo se comercializan calostros y yogures presurizados. Además, no existen estudios sobre la aplicación de altas presiones a formulas infantiles. Así, el objetivo de este estudio fue evaluar y comparar el efecto de un tratamiento UHT y de presión a 650 MPa durante 5 min a 15°C en una fórmula infantil. Los parámetros utilizados fueron el grado de desnaturalización de las proteínas lácteas, y en particular de las proteínas minoritarias del suero, como lactoferrina e inmunoglobulina A, y la formación de lactulosa y furosina.

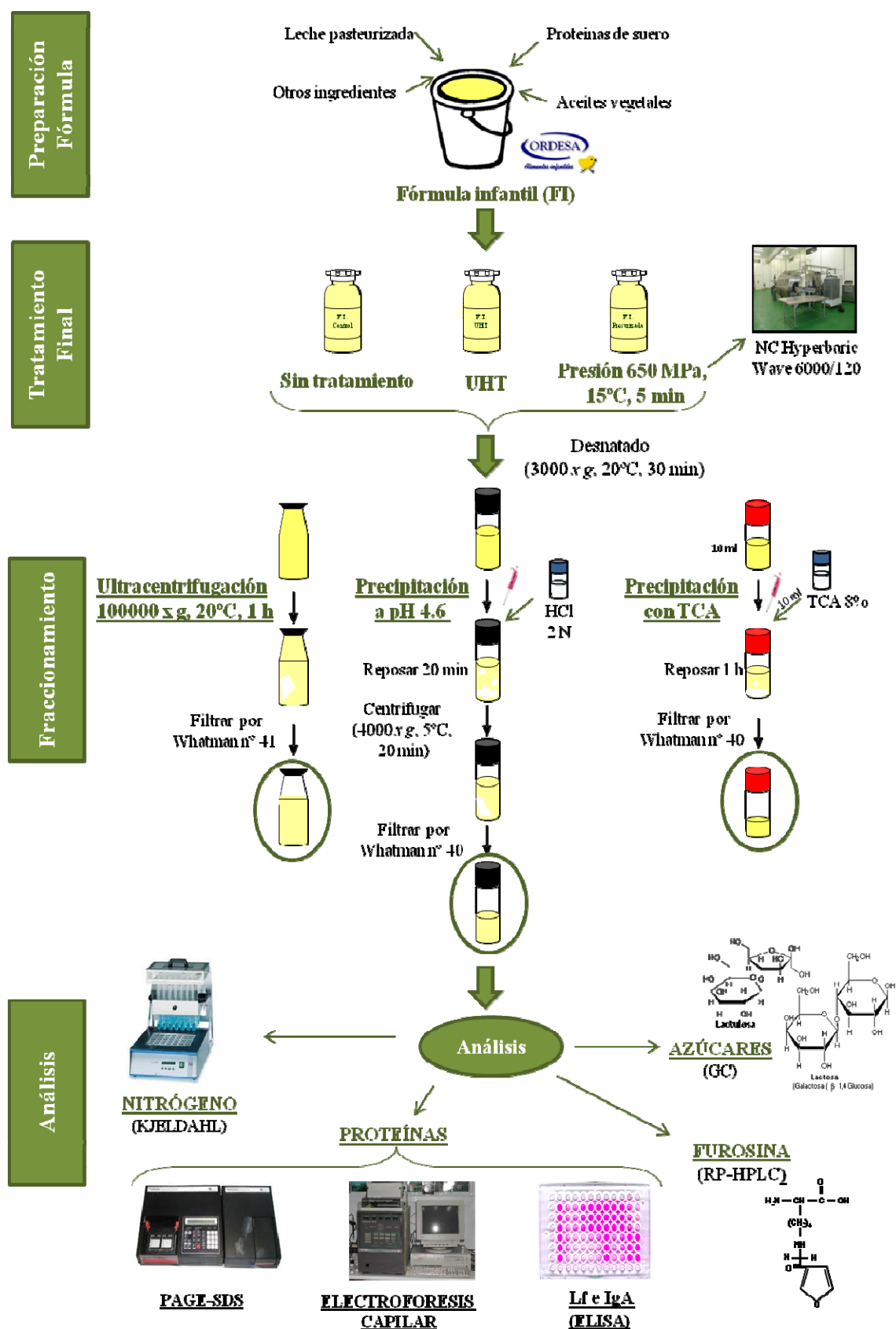
## **I.2. Materiales y Métodos**

La Figura 13 resume el procedimiento experimental seguido en este trabajo.

### **I.2.1. Preparación de las muestras y tratamientos aplicados**

Para realizar este estudio se utilizó una fórmula infantil preparada por Ordesa S.A, siguiendo el procedimiento habitual excepto que no se le aplicó el último tratamiento térmico, ni se atomizó. Esta fórmula se preparó a partir de leche desnatada y pasteurizada a baja temperatura, con adición de proteínas de suero. Tras su preparación, la fórmula se dividió en 3 alícuotas. Una se dejó en refrigeración, ya que se utilizó como control, otra se calentó a 142-146°C durante 4.7 seg (tratamiento UHT) y, finalmente, la última alícuota se sometió a un tratamiento de presión a 650 MPa durante 5 min a 15°C. En este último caso, se utilizó un equipo de alta presión a escala industrial Wave 6000/120 (NC Hyperbaric, Burgos, España), con capacidad para 120 L. Este equipo usa agua como fluido transmisor de la presión y tiene 3 bombas para generar la presión hidráulicamente, la cual sube a una velocidad de 3.04 MPa/seg y se libera en 1.5 seg.

Las fórmulas se atemperaron a 37°C durante 30 min, se centrifugaron a 3000  $\times$  g a 20 °C durante 30 min y se filtraron por lana de vidrio con el fin de desnatarlas.



**Figura 13.** Esquema de la preparación, tratamientos térmicos y con alta presión, fraccionamiento y análisis de las muestras.

### **I.3. Resultados**

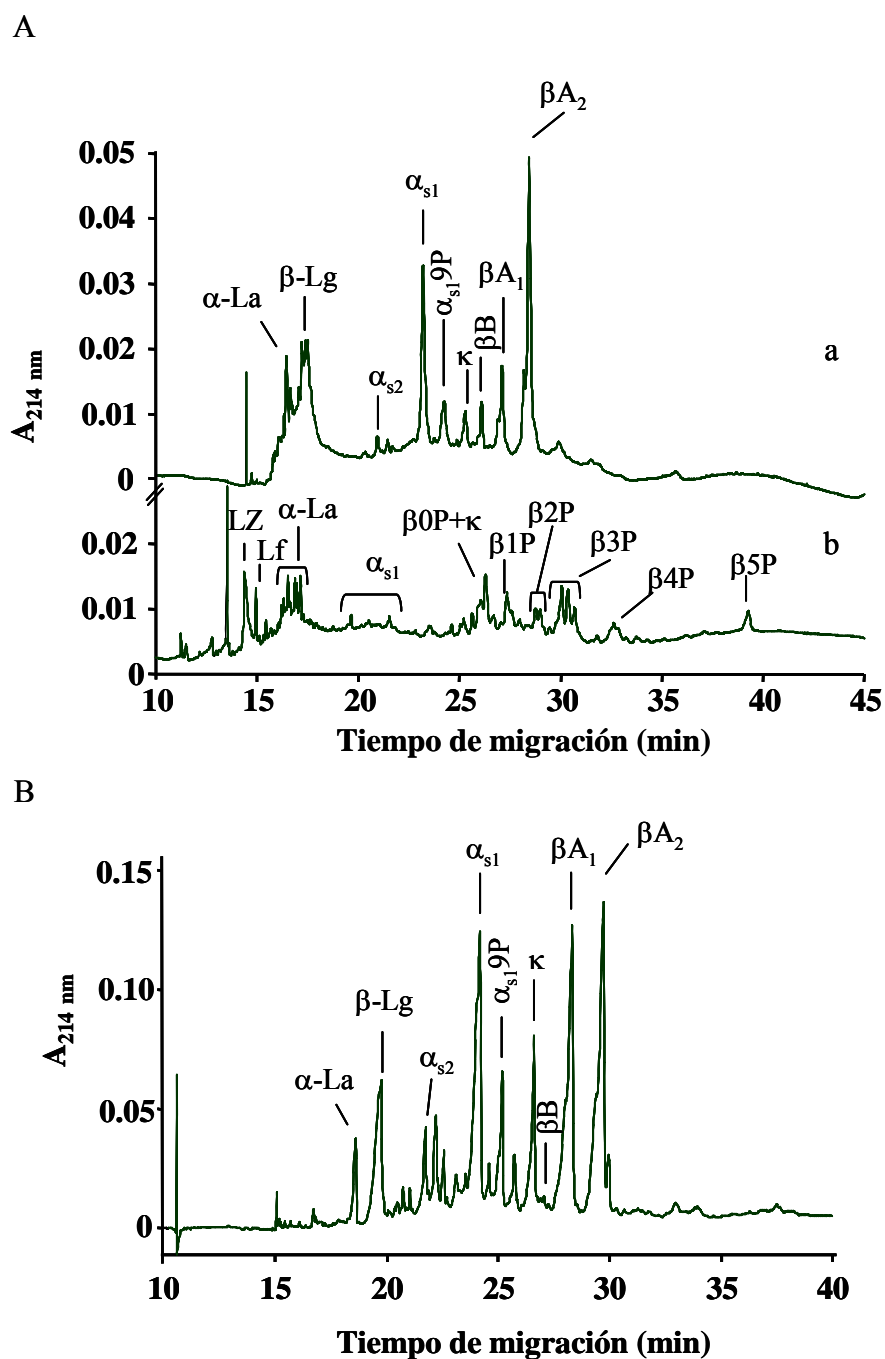
#### **I.3.1. Efecto de los tratamientos UHT y con alta presión en las proteínas mayoritarias de la leche**

La Figura 14A, muestra el electroforegrama (EC) de la fórmula infantil control y de una leche humana cuyas proteínas se han identificado de acuerdo con Manso y col. (2007) (a y b respectivamente). El perfil electroforético de la fórmula se asemejó más al de una leche de vaca (Figura 14B), aunque con una mayor relación de proteína de suero a caseína, más próxima a la de la leche de mujer. En la fórmula, destaca, en la zona de las proteínas de suero, la aparición de varios picos adyacentes a cada pico principal. Éstos se atribuyeron a distintos estados de glicosilación de las seroproteínas debido a la reacción de Maillard con la lactosa presente en la leche. Los tiempos de migración mayores que presentan las formas lactosiladas de las proteínas de suero se deben a que la unión covalente de la lactosa a la lisina reduce la carga neta positiva a pH ácido y aumenta el peso molecular (Recio y col., 2001). El hecho de que aparezcan picos correspondientes a varias formas glicosiladas de cada proteína posiblemente se deba a la existencia de proteínas con diferentes grados de lactosilación.

La Tabla 4 muestra el contenido en proteína de las fórmulas infantiles, de los sobrenadantes de ultracentrifugación (SU) y de las fracciones solubles a pH 4.6, así como el nitrógeno no proteico (NNP, soluble en TCA al 4%). La concentración de proteína soluble en los SU fue similar en todas las fórmulas estudiadas, pero el contenido en proteína soluble a pH 4.6 disminuyó en el orden: fórmula control > fórmula presurizada > fórmula UHT. El NNP disminuyó en, aproximadamente, un 15% en las fórmulas UHT y presurizada, respecto a la fórmula control.

Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio (Manso y col, 2007) han puesto de manifiesto que el contenido medio en proteína de la leche humana es de aproximadamente un 0.94%, lo que supone menos de un 30% del contenido de la leche bovina y un 60% del de la fórmula analizada en este estudio. Además, a lo largo de la lactación tiene lugar una progresiva disminución, de una media en torno al 1.46% al final de la primera semana, hasta un 0.66% a la semana 18. Por otra parte, la relación de caseínas a proteínas de suero recomendada para la elaboración de fórmulas infantiles es 40:60, mientras que, en la fórmula,

considerando como proteínas de suero sólo a las solubles a pH 4.6, la relación sube a 60:40, aproximadamente.



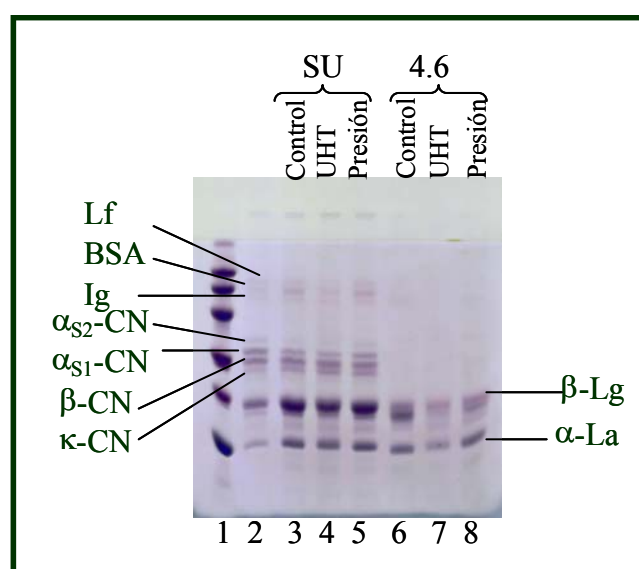
**Figura 14.** Electroforegramas de fórmula infantil control (a) y de leche humana (b) (A) y leche cruda de vaca (B).

**Tabla 4.** Contenido en proteína total, proteína soluble en los sobrenadantes de ultracentrifugación (SU) y a pH 4.6 (4.6), y nitrógeno no proteico (NNP) de las fórmulas infantiles control, UHT y presurizada a 650 MPa durante 5 min (% , p/v).

Tratamiento	Proteína (%)			NNP (%)
	Total	SU	4.6	
Control	1.60±0.01	1.04 <sup>a</sup> ±0.01	0.66 <sup>c</sup> ±0.00	0.05 <sup>b</sup> ±0.00
UHT		0.91 <sup>a</sup> ±0.01	0.44 <sup>a</sup> ±0.00	0.04 <sup>a</sup> ±0.00
Presión (650 MPa)		0.99 <sup>a</sup> ±0.09	0.54 <sup>b</sup> ±0.00	0.04 <sup>a</sup> ±0.00

<sup>a-d</sup> Diferentes superíndices, en columnas, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) producidas por el tratamiento.

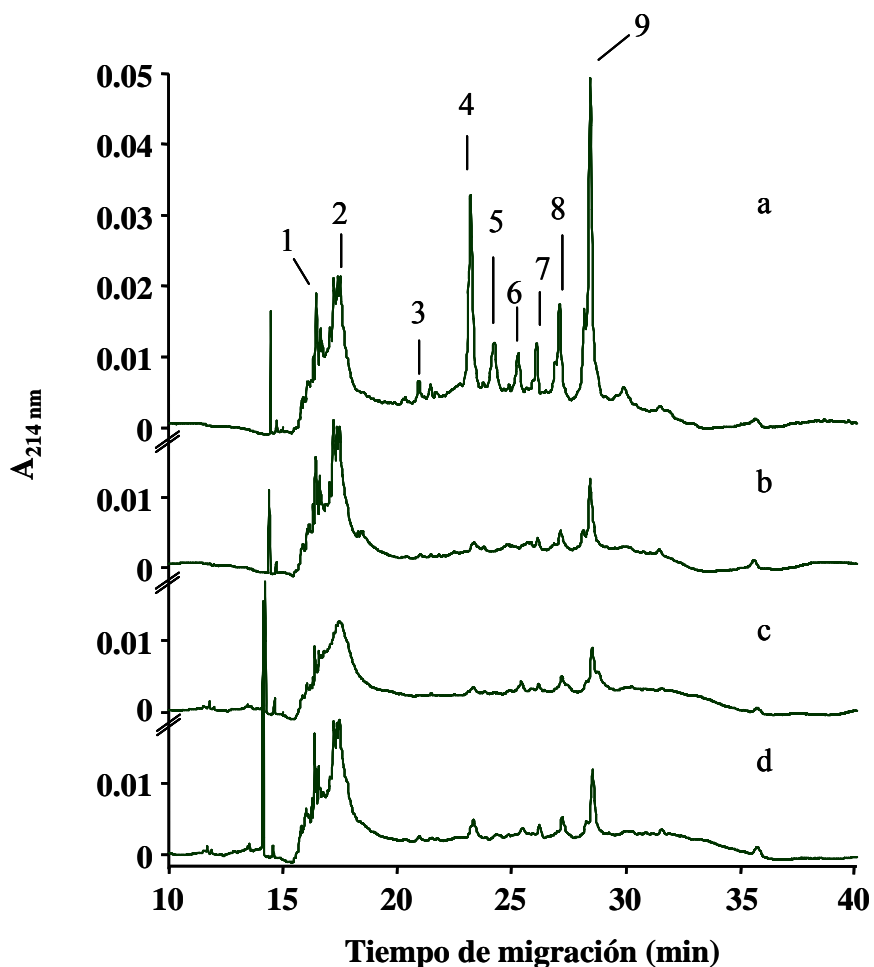
Los análisis mediante PAGE-SDS y EC de estas fracciones (Figuras 15, 16 y 17) complementaron los resultados anteriores. Como muestra la Figura 15, los sobrenadantes de ultracentrifugación presentaron, en los tres casos, bandas correspondientes a las principales caseínas ( $\alpha_{S2}$ -,  $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -) y, tanto en la fórmula presurizada (calle 5) como en la control (calle 3), bandas de proteínas minoritarias: Lf, BSA e inmunoglobulina, que, probablemente, se desnaturalizaron parcialmente tras el tratamiento UHT (calle 4). En las fracciones solubles a pH 4.6 (calles 6, 7, 8) se observó una disminución de la  $\beta$ -Lg y de la  $\alpha$ -La solubles en las fórmulas procesadas (UHT y alta presión) pero, sobre todo, en la fórmula UHT.



**Figura 15.** PAGE-SDS de las fórmulas infantiles. 1: Marcador de pesos moleculares; 2: fórmula de partida (control); 3 a 5: sobrenadantes de ultracentrifugación (SU) de las fórmulas control, UHT y presurizada; 6 a 8: fracciones solubles a pH 4.6 de las fórmulas control, UHT y presurizada.



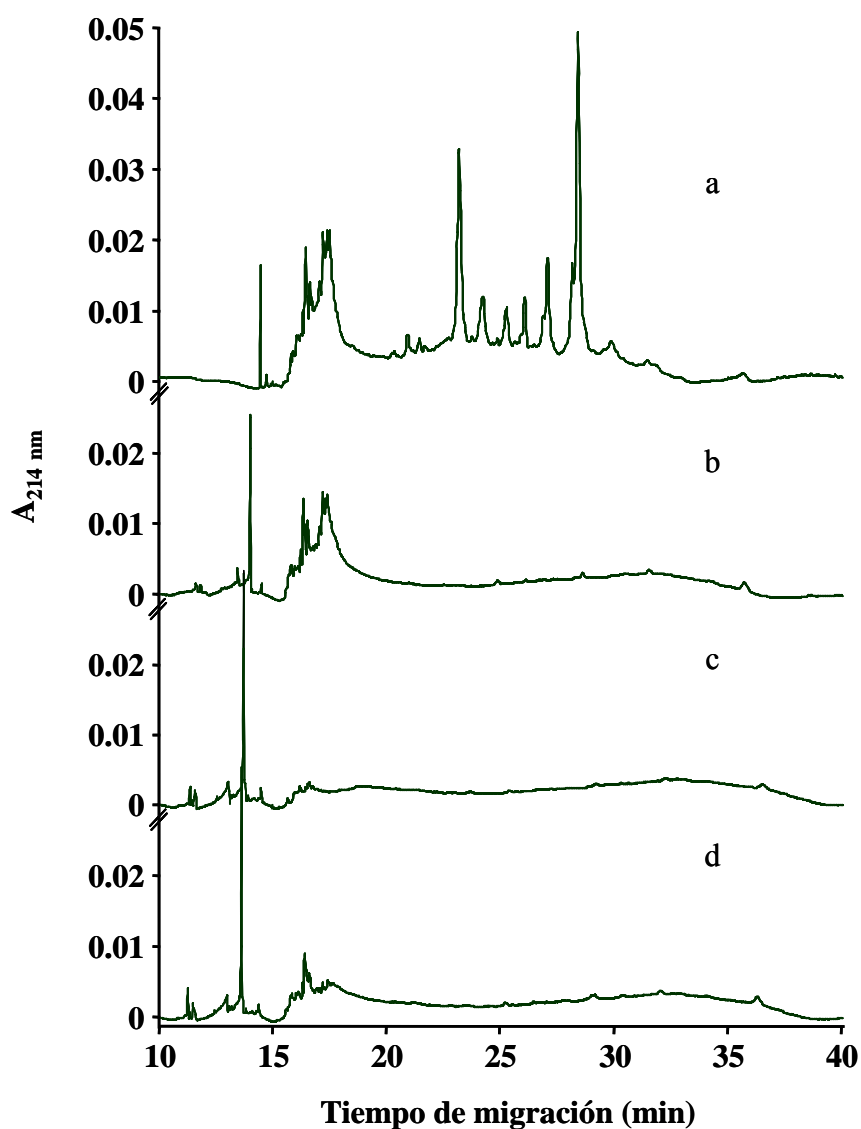
Se observó que el tratamiento a 650 MPa de la fórmula infantil no indujo la solubilización de caseína micelar, siendo los niveles de caseínas no sedimentables similares en la fórmula control y en la presurizada, mientras que el tratamiento UHT disminuyó los niveles de caseína soluble (Figura 16).



**Figura 16.** Electroforegramas de la fórmula infantil control (a), de los sobrenadantes de ultracentrifugación (SU) de la misma fórmula (b), y tratada mediante UHT (c) y alta presión (650 MPa, 5 min) (d). 1:  $\alpha$ -La; 2:  $\beta$ -Lg; 3:  $\alpha$ S<sub>2</sub>-CN; 4:  $\alpha$ S<sub>1</sub>-CN; 5:  $\alpha$ S<sub>1</sub>-CN 9P; 6:  $\kappa$ -CN; 7:  $\beta$ B-CN; 8:  $\beta$ A<sub>1</sub>-CN; 9:  $\beta$ A<sub>2</sub>-CN.

En el caso de las fracciones solubles a pH 4.6, la modificación en la forma y área de los picos debida a la glicosilación impidió la correcta cuantificación de las proteínas. Sin embargo, los electroforegramas mostrados en la Figura 17 indican claramente que ambos tratamientos, UHT y presión, produjeron una gran desnaturalización de las proteínas mayoritarias del suero, especialmente en el caso de la fórmula UHT, como ya apuntaban los

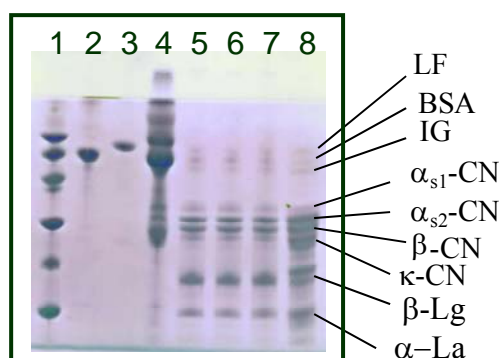
análisis mediante PAGE-SDS (Figura 15). La comparación de las Figuras 16 y 17 también reveló que, tanto en la fórmula UHT como en la presurizada, una importante proporción de las proteínas desnaturalizadas permaneció soluble en los sobrenadantes de ultracentrifugación.



**Figura 17.** Electroforegramas la fórmula infantil control (a) y de la fracción soluble a pH 4.6 de la misma fórmula (b) y tratada mediante UHT (c) y alta presión (650 MPa, 5 min) (d).

### I.3.2. Efecto de los tratamientos UHT y con alta presión en las proteínas minoritarias del suero

El contenido en Lf de la fórmula infantil control detectado por ELISA fue de 0.75 mg/100 g de proteína, similar al de la fórmula tratada por presión, con 0.66 mg/100 g de proteína. Por otro lado, no pudo detectarse Lf por ELISA en la fórmula UHT, a pesar de que el análisis por PAGE-SDS de las fórmulas completas mostró la presencia de una banda correspondiente a Lf en las 3 muestras estudiadas (control, presurizada y UHT), como se muestra en la Figura 18.

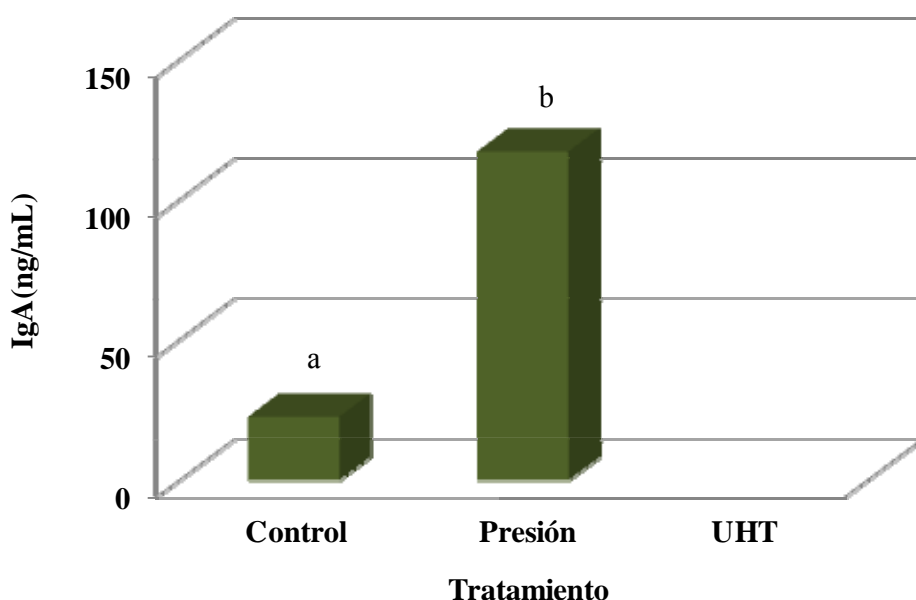


**Figura 18.** PAGE-SDS de las fórmulas infantiles. 1: Marcador de pesos moleculares; 2: BSA; 3: Lf; 4: Suero bovino enriquecido en Ig; 5: Fórmula de partida; 6: Fórmula presurizada a 650 MPa, 5 min; 7: Fórmula sometida a tratamiento UHT; 8: Leche cruda de vaca.

Es posible que el tratamiento UHT produjera una desnaturalización importante en la Lf y, aun observándose la banda correspondiente mediante PAGE-SDS, a lo que podría contribuir la presencia del detergente y de  $\beta$ -mercaptoetanol en el tampón de la muestra, el anticuerpo no reconociera los sitios de unión. Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento con alta presión no cambió su estructura, o por lo menos los sitios de unión con el anticuerpo, siendo su unión igual de eficaz que en la fórmula sin tratar.

El contenido de IgA observado en las fórmulas infantiles fue de 22.32 y 116.98 ng/mL en las fórmulas control y presurizada respectivamente. No se pudo detectar IgA en la fórmula infantil UHT con el método utilizado (Figura 19), al igual que sucedió en el caso de la Lf, lo que probablemente se debió a la desnaturalización de la proteína o a la alteración de los puntos de unión con el anticuerpo.

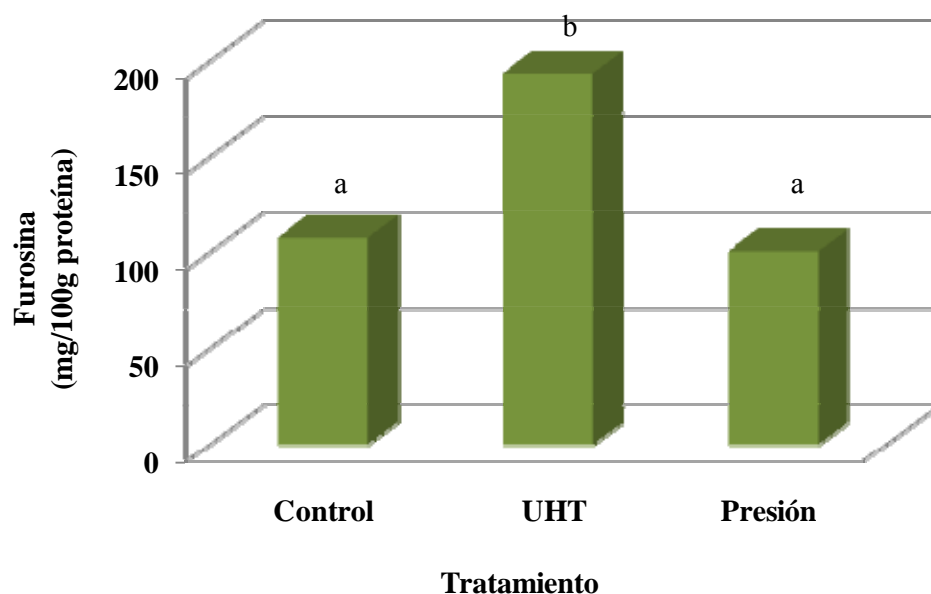
Aunque hay una gran variabilidad en los datos aportados por distintos autores, en leche humana, la Lf supone aproximadamente el 10-25% y la IgA el 6-16% de la proteína total (Manso y col., 2007), lo que supone valores muy superiores a los encontrados para la fórmula en este estudio.



**Figura 19.** Contenido en IgA de la fórmula control, presurizada a 650 MPa, 5 min y UHT. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) producidas por el tratamiento.

### **I.3.3. Efecto del tratamiento UHT y de presión en el avance de la reacción de Maillard y la isomerización de la lactosa**

Para evaluar el daño térmico producido por los tratamientos estudiados se estudió el contenido de lactulosa y furosina. El desarrollo de la reacción de Maillard fue estudiado mediante la cuantificación de furosina en las fórmulas. El tratamiento con alta presión no produjo variación del contenido en furosina, pero el tratamiento UHT aumentó éste significativamente, como se puede observar en la Figura 20.



**Figura 20.** Contenido en furosina de las fórmulas infantiles control, UHT y presurizada a 650 MPa durante 5 min. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) producidas por el tratamiento.

Como era de esperar, el tratamiento UHT favoreció la isomerización de la lactosa y la formación de lactulosa (Tabla 5). El contenido en lactulosa en la fórmula tratada UHT fue alto e indicativo de un calentamiento muy intenso. En cambio, el tratamiento con alta presión no produjo isomerización de la lactosa. El contenido en lactosa en las fórmulas no varió significativamente debido a los tratamientos aplicados.

**Tabla 5.** Contenido en lactosa (La) y lactulosa (Lu) en las fórmulas infantiles.

Tratamiento	La (g/L)	Lu (mg/L)
Control	119.47 <sup>a</sup> ±10.13	27.13 <sup>a</sup> ±2.13
UHT	103.83 <sup>a</sup> ±9.39	616.53 <sup>b</sup> ±44.07
Presión (650 MPa)	109.01 <sup>a</sup> ±5.33	36.19 <sup>a</sup> ±3.41

<sup>a-b</sup> Diferentes superíndices, en columnas, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) producidas por el tratamiento.

## **I.4 Discusión**

El uso de un tratamiento UHT para la estabilización final de una fórmula infantil basada en distintos ingredientes lácteos produjo una modificación mucho más acusada en sus componentes proteicos mayoritarios y minoritarios que un tratamiento con alta presión, lo que puede afectar negativamente a sus propiedades nutricionales.

Se utilizaron los niveles de lactulosa y furosina como índices de daño térmico. La furosina, indicador de las primeras etapas de la reacción de Maillard, es un aminoácido que se forma durante la hidrólisis ácida de los compuestos de Amadori, fructosil-lisina, lactulosil-lisina y maltulosil-lisina (Erbersdobler y Hupe, 1991). La reacción de Maillard se ve promovida por la temperatura en mayor medida en condiciones de  $a_w$  intermedia (entre 0.5 y 0.8), que concentra a los reactivos y disminuye su movilidad (Ames, 1990). Es de destacar que el contenido en furosina de la fórmula de partida fue relativamente elevado (Figura 20), lo que, de acuerdo con el contenido en proteínas de suero solubles a pH 4.6 (6.6 g/L -Tabla 4- frente a unos 8 g/L, aproximadamente, de una leche cruda) y su modificación por lactosilación, tal y como se observa en el análisis por electroforesis capilar (Figura 14), indicaría que se habría empleado suero y/o leche en polvo en la fabricación de la fórmula control, puesto que la deshidratación que se produce durante los procesos de atomización, así como el almacenamiento posterior de los productos en polvo favorecen la reacción de Maillard. El tratamiento UHT elevó significativamente el contenido en furosina hasta niveles similares a los observados por otros autores (Guerra-Hernández y col., 2002; Ferrer y col., 2003; Morales y col., 2004). El contenido en furosina varía dependiendo del tratamiento térmico utilizado, la concentración azúcares reductores y el tiempo y las condiciones de almacenamiento, lo que hace que exista un amplio rango en las medidas. Por su parte, el tratamiento con alta presión no produjo un aumento del contenido en furosina, como se puede observar en la Figura 20, por lo que no modificó la disponibilidad de la lisina en la fórmula.

La lactulosa es un disacárido producido por la isomerización de la lactosa en disoluciones alcalinas y durante el tratamiento térmico de la leche, que se forma sobre todo durante los tratamientos de esterilización y UHT de productos líquidos (Guerra-Hernández, 2002). Este disacárido no está presente en la leche cruda por lo que se le considera un buen indicador para evaluar el daño térmico (López-Fandiño y Olano, 1999). El contenido en la fórmula control (aproximadamente 27 mg/L, Tabla 5) se encontró dentro de los márgenes

descritos para leche en polvo comercial (en torno a 23-78 mg/L de producto reconstituido, Corzo y col., 1994), corroborando el uso de productos en polvo para su elaboración. Como era de esperar, el tratamiento UHT favoreció la isomerización de la lactosa y la formación de lactulosa (Tabla 5). El contenido en lactulosa en la fórmula UHT fue indicativo de un calentamiento muy intenso, bastante superior a los encontrados en la bibliografía para fórmulas comerciales reconstituidas elaboradas a base de leche o de leche con proteínas de suero, (29-108 mg/L y 97-132 mg/L, respectivamente, Pereyra-González y col., 2003) y más típico de leche estéril (la Federación Internacional de Lechería propuso en 1992 el límite de 600 mg/L de lactulosa para distinguir la leche esterilizada de la leche UHT).

El tratamiento UHT condujo a una notable desnaturalización de las seroproteínas (el nitrógeno soluble a pH 4.6 disminuyó en torno al 33% respecto a la fórmula control). En la fórmula infantil tratada con presión la desnaturalización fue menor (con una disminución de, aproximadamente, un 18%) (Tabla 4, Figura 5). Los tratamientos térmicos y los tratamientos con alta presión alteran la estructura de las seroproteínas lácteas. Así, el desplegamiento producido en la  $\beta$ -Lg tanto por temperatura como por presión produce la exposición del grupo sulfhidrilo libre, favoreciendo que reaccione inter e intramolecularmente con otros grupos sulfhidrilo o puentes disulfuro de proteínas como la propia  $\beta$ -Lg, la  $\kappa$ -CN y la  $\alpha$ <sub>s2</sub>-CN, formando de esta manera agregados, que pueden ser solubles o insolubles (Patel y col., 2006). En tratamientos térmicos de larga duración (30 min) aplicados a leche reconstituida, también se ha observado un aumento del contenido de la  $\beta$ -Lg y  $\alpha$ -La desnaturalizadas a partir de los 70°C, aunque la desnaturalización no es completa hasta los 100°C, aproximadamente (Anema, 2008a). Por otra parte, debe tenerse en cuenta que la glicosilación aumenta la termoestabilidad de las proteínas de suero y conduce a una menor oligomerización de éstas como consecuencia de su desnaturalización (Mulsow y col., 2009). En el caso de los tratamientos con presión, en leche reconstituida se ha observado que la  $\alpha$ -La es más resistente a la desnaturalización por presión que la  $\beta$ -Lg, comenzando a desnaturalizarse a presiones  $\leq 500$  MPa (30 min) mientras que la  $\beta$ -Lg lo hace a presiones  $\geq 200$  MPa. A 600 MPa el contenido de  $\beta$ -Lg y  $\alpha$ -La desnaturalizadas es de en torno al 80 y 20%, respectivamente (Anema, 2008a).

El estudio realizado por EC mostró que la solubilización micelar en la fórmula presurizada (Figura 16) fue diferente a la de una leche cruda presurizada. López-Fandiño y col. (1998) observaron que la presión induce la liberación de todas las caseínas a la fracción

soluble, debido a la disgregación micelar que produce, siendo el orden de solubilización  $\beta$ -CN >  $\kappa$ -CN >  $\alpha_{s1}$ -CN >  $\alpha_{s0}$ -CN >  $\alpha_{s2}$ -CN. Sin embargo, en la fórmula presurizada no se observó solubilización de caseínas por el tratamiento aplicado. Este hecho podría deberse a que se sometió al tratamiento con alta presión a una fórmula elaborada a partir de productos en polvo reconstituidos, en la que, como se mencionó en el párrafo anterior ya había proteínas de suero desnaturalizadas (Figura 17). Kelly y col. (2002) indicaron que la desnaturalización previa, ya sea por calor o por presión de las proteínas de suero y su consecuente interacción con la  $\kappa$ -CN podría proteger a la micela de disgregarse por la presión. En el caso de la leche cruda, probablemente, las proteínas de suero se desnaturalizan bajo la alta presión, interaccionando con fragmentos micelares, lo que podría limitar su reasociación al liberarse la presión. En el caso de las fórmulas, las micelas podrían tener ya proteínas desnaturalizadas unidas a su superficie debido a un tratamiento térmico previo, lo que facilitaría su reagregación (López-Fandiño, 2006a).

En la actualidad hay una gran tendencia en suplementar a las fórmulas infantiles con Lf, ya que esta proteína presenta actividad antibacterina, antiviral, y antifúngica y está implicada en la respuesta inmune y en la regulación y consumo del hierro intestinal (Jenssen y Hancock, 2009; Tomita y col., 2009). Además, la Lf está en una concentración más elevada en la leche humana que en la leche de vaca (Fox y McSweeney, 1998). Junto a la IgA, representa entre el 30 y 40% del contenido en proteínas de la leche humana (Chierici y Vigi, 1994). Indyk y Filonzi (2005) estimaron un contenido de 0.4 mg/100g y 14.8 mg/100g para formulas no suplementadas y suplementadas con Lf usando el mismo sistema de detección, aunque su contenido puede variar dependiendo del método de análisis utilizado (Indyk y Filonzi, 2005) y de la composición de la fórmula. La Lf se desnaturaliza a temperaturas de pasteurización (Paulsson y col., 1993). Scharcz y col. (2008) aportaron espectros de discoisismo circular a 70°C que muestran que la estructura secundaria de la Lf cambia drástica e irreversiblemente cuando la temperatura aumenta gradualmente. Sin embargo, en una simulación de una pasteurización (72°C durante 20 seg) no observaron ningún efecto en la estructura secundaria de la proteína, lo que indica que, si la temperatura, se alcanza en un breve periodo de tiempo, la Lf no pasa por el mismo estado de desplegamiento observado cuando el aumento de la temperatura es gradual. Además, se ha observado que la forma apo de esta proteína es más sensible al calor que la forma holo y, a pH 7, la apo LF se desnaturaliza entre 60 y 65°C mientras que la holo forma permanece nativa hasta los 80°C



(Sreedhara y col., 2010). Por otra parte, cuando la leche se calienta, la Lf establece interacciones intermoleculares vía puentes disulfuro con las caseínas y otras proteínas séricas (Brisson y col., 2007), lo que explicaría también la menor detección de Lf por anticuerpos en leches tratadas por UHT a pesar de que la banda correspondiente a la Lf se resolubilice en el tampón de la muestra usado en PAGE-SDS.

La IgA es otra proteína importante en la composición de las fórmulas, porque interviene en los mecanismos de defensa gastrointestinal (Bakker-Zierikzee y col., 2006). Ford y col. (1977) observaron una reducción del contenido de IgA en leche humana pasteurizada (56°C, 30 min) del 10%, pasando al 80% en tratamientos con temperaturas más elevadas (80°C, 15 min). Además, Viazis y col. (2007) observaron que la inmunoreactividad y la concentración de IgA detectada en leche humana presurizada (400 MPa durante 30, 60, 90 y 120 min) fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) que en la misma leche pasteurizada. Sin embargo, estos autores encontraron una menor concentración de IgA en la leche presurizada que en la leche sin tratar, a diferencia de nuestro estudio, donde la fórmula presurizada presentó un llamativo aumento del contenido de IgA. Esta diferencia podría deberse al hecho de que el tiempo de presurización utilizado en nuestro caso fue menor, de 5 min frente a 30 min, lo que generaría menores cambios estructurales, o incluso podría producir un desplegamiento que facilitase la unión al anticuerpo.

## **I.5. Conclusiones**

Los resultados obtenidos sugieren que la aplicación de un tratamiento con alta presión a 650 MPa durante 5 min a fórmulas infantiles, sustituyendo el tratamiento térmico final al que se ven sometidas durante su fabricación, no produce isomerización de la lactosa, ni avance de la reacción de Maillard y conduce a una menor desnaturalización de las proteínas de suero, por lo que mejora la calidad nutritiva de las fórmulas. Además, la estructura de las proteínas minoritarias del suero, lactoferrina e inmunoglobulina A secretora, se ve menos afectada por el tratamiento con presión que por el tratamiento UHT, medido por su unión a anticuerpos, por lo que se podrían obtener fórmulas infantiles con mejores actividades biológicas para los recién nacidos. a pesar de producir menores cambios químicos, la efectividad de los tratamientos con alta presión está condicionada a la comprobación de que conducen a productos de aceptable calidad microbiológica.

## **CAPÍTULO II**

*Tratamientos con alta presión en equipos a escala industrial y piloto.*

*Efecto de las condiciones del tratamiento en la distribución proteica  
en diferentes fracciones lácteas*



## **II.1. Introducción**

La creciente demanda de los consumidores por productos que presenten nuevas o mejores características sensoriales y nutricionales, junto con una mayor durabilidad, ha retado a la industria alimentaria a desarrollar técnicas capaces de mantener los alimentos seguros por más tiempo y de mejorar sus propiedades (Norton y Sun, 2008). En concreto, el procesado con alta presión, que ha experimentado un enorme crecimiento en los últimos 20 años llegando a ser una realidad industrial, puede facilitar la elaboración de productos similares a los alimentos frescos con una mayor vida útil, además de proporcionar nuevos productos con mejores cualidades, principalmente a través de cambios en la conformación de las proteínas alimentarias que modifican sus propiedades funcionales (López-Fandiño, 2006b).

La leche fue el primer alimento en someterse a un tratamiento con alta presión (Hite, 1899), sin embargo, hasta el momento, hay solamente unos pocos productos lácteos presurizados comerciales, como yogurt o calostro (Kelly y Zeece, 2009). Las aplicaciones industriales de las altas presiones están orientadas principalmente a mejorar la seguridad y la estabilidad, mientras que otras aplicaciones encaminadas a inducir cambios estructurales que cambien la funcionalidad de las proteínas lácteas, se han explotado más escasamente. Los tratamientos con alta presión producen importantes modificaciones en las proteínas y en el balance mineral de la leche. Como resultado, se produce disgregación y reagregación de las micelas de caseína, liberación de caseínas solubles y desnaturalización de las proteínas de suero (Huppertz y col., 2006a; López-Fandiño, 2006a). Como consecuencia de la ruptura micelar, se forman nuevas estructuras proteicas difíciles de lograr mediante el uso de métodos convencionales de procesado, las cuales influyen en las propiedades de coagulación enzimática, favorecen la coagulación ácida y pueden actuar como unidades funcionales para la encapsulación y liberación de nutrientes en productos lácteos (Orlien y col., 2010). En cualquier caso, la intensidad, la duración y la temperatura de los tratamientos, así como, del pH y de la concentración de proteína influyen en los cambios originados por las altas presiones (Law y col., 1998; López-Fandiño y col., 1998; Arias y col., 2000; Huppertz y col., 2004b; Anema y col., 2005a; Huppertz y De Kruif, 2006; Anema, 2008b; Orlien y col., 2010). Actualmente, el efecto de la mayoría de estas variables se conoce bien, pero rara vez se ha estudiado la influencia del tipo de equipo de alta presión (Anema y col., 2005b).

Los equipos de alta presión están formados por una cámara, que es un cilindro lleno de un fluido transmisor de la presión, generalmente agua potable o una mezcla de agua y aceite; una o varias bombas generadoras de la presión; un dispositivo de control de la temperatura y el sistema de control del equipo (Huppertz y col., 2002). Los equipos de procesado con alta presión presentan diferentes características como el tamaño (existiendo a escala de laboratorio, piloto e industrial), la orientación, vertical u horizontal, etc. Las especificaciones del equipo indican la presión máxima de la cámara, su diámetro interno, la altura o longitud interior de la cámara, la velocidad de subida y bajada de la presión, el fluido transmisor de la presión y el rango de temperatura. En la industria alimentaria, se utilizan cámaras de presurización con cientos de litros de volumen, que trabajan normalmente en el intervalo de 250 a 600 MPa, que se mantienen entre 1-8 minutos con tiempos rápidos de subida y bajada de la presión, puesto que la duración del ciclo o la velocidad de producción son factores importantes a controlar. También hay equipos a escala de laboratorio, capaces de alcanzar presiones de hasta 1400 MPa, con diseños específicos o versátiles (Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas, 2011).

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la influencia del tipo de equipo de alta presión y de la velocidad de despresurización en la distribución de las proteínas lácteas entre las fases coloidal y soluble de la leche y en la desnaturalización de las proteínas de suero, en tratamientos de presión entre 250 y 650 MPa. Además, también se presurizaron sobrenadantes de ultracentrifugación obtenidos de leche desnatada con fines comparativos.

## **II.2. Materiales y Métodos**

La Figura 21 resume el procedimiento experimental seguido en este trabajo.

### **II.2.1. Preparación de las muestras**

Para llevar a cabo los experimentos de presurización, se utilizó tanto leche desnatada de vaca como sobrenadantes de ultracentrifugación (SU) obtenidos a partir de ésta. Tras la recogida de la leche cruda en una granja local, se procedió a su desnatado, calentándola a 37°C durante 30 min y centrifugándola a 3000 x g, 20°C durante 30 min. Finalmente, el sobrenadante se filtró por lana de vidrio, para así retener los restos de grasa. Por otro lado, los SU se obtuvieron ultracentrifugando alícuotas de leche desnatada a 100000 x g, 20°C durante

1 h en una ultracentrífuga Beckman L70 (Beckman Instruments Inc., San Ramón, CA) usando el rotor 70 Ti (Figura 1). Estos sobrenadantes se guardaron en refrigeración a 4°C por un máximo de 18 h antes de los tratamientos con alta presión.

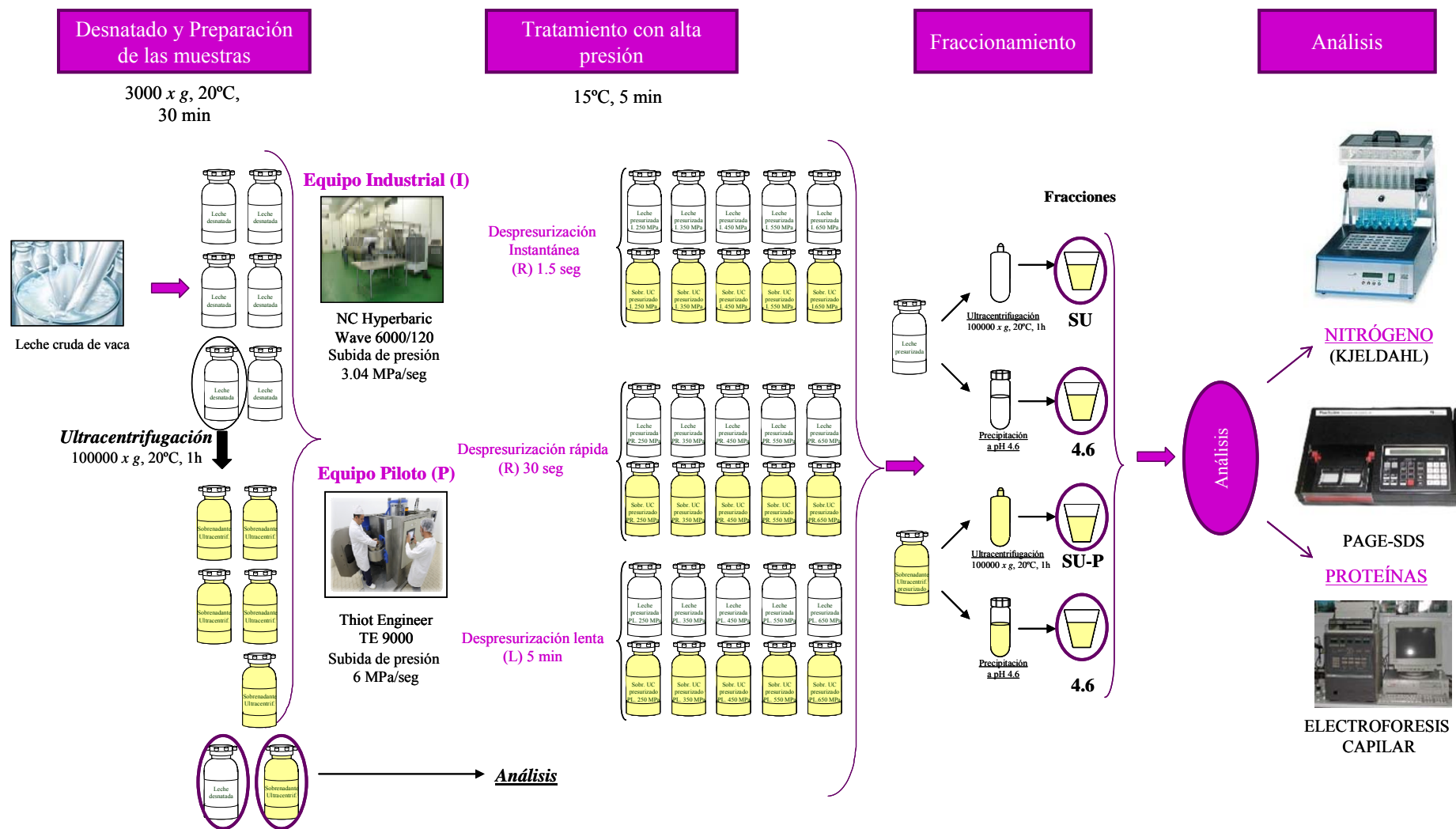
### **II.2.2. Tratamientos de alta presión**

Las muestras (leche desnatada y SU), atemperadas a 15°C, se presurizaron a 250, 350, 450, 550 y 650 MPa en un equipo industrial y en un equipo piloto (Figura 1). El equipo industrial estaba formado por una cámara de presurización con capacidad de 120 L, con agua como fluido transmisor de la presión y 3 bombas para generar la presión hidráulicamente (Wave 6000/120, NC Hyperbaric, Burgos, España). El equipo piloto utilizado (modelo TE 9000, Thiot Ingenierie, NC Hyperbaric, Bretenoux, France-Burgos, España) tenía una cámara de presurización de 2 L de capacidad, recubierta por una camisa de agua capaz de regular la temperatura (5-90°C), y una bomba que genera la presión mecánicamente. En este caso, el fluido transmisor de presión fue aceite de silicona. A diferencia del industrial, el equipo piloto permitió ajustar el tiempo de subida y bajada de la presión.

La presión aumentó a una velocidad de 3.04 y 6 MPa/seg en el industrial y en el piloto respectivamente, se mantuvo durante 5 min y se liberó en 1.5 seg en el equipo industrial (tratamientos IR – equipo industrial con despresurización rápida-) y en 30 seg o 5 min en el equipo piloto (PR- equipo piloto con despresurización rápida y PL- equipo piloto con despresurización lenta, respectivamente).

La temperatura del fluido transmisor de la presión se registró durante los tratamientos. La temperatura inicial fue  $14 \pm 2^\circ\text{C}$ , la cual aumentó durante la subida de la presión. Así, durante la fase de mantenimiento de la presión, la temperatura fue de 25.9 y 39.5°C a 350 MPa o de 32.5 y 46.9°C a 650 MPa, en los equipos industrial y piloto, respectivamente.

Se realizaron 2 experimentos independientes por cada tratamiento de alta presión en el mismo día. Tras los tratamientos de alta presión, las muestras se almacenaron toda la noche a 4°C antes de hacer los fraccionamientos y los análisis.



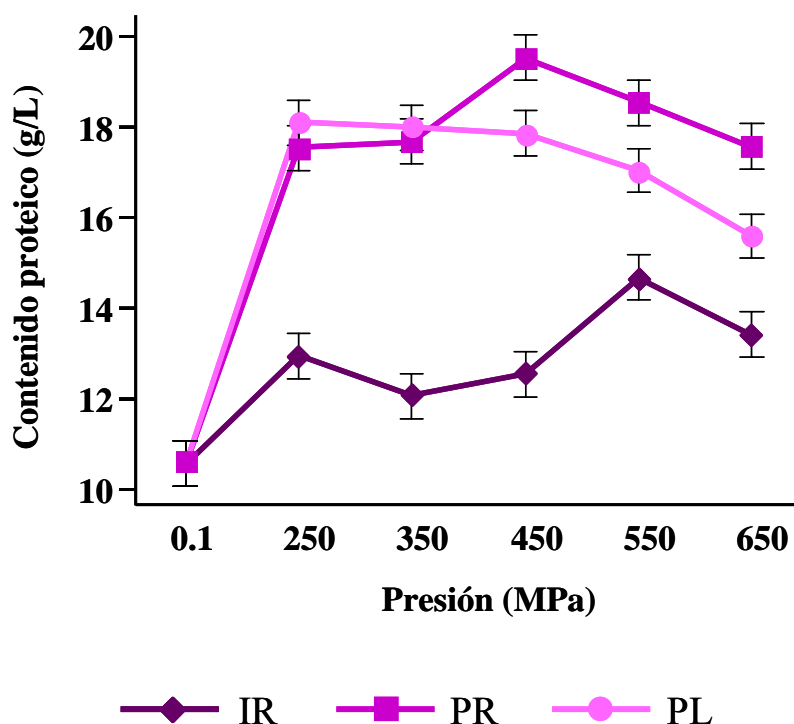
**Figura 21.** Esquema de la preparación, tratamientos con alta presión, fraccionamiento y análisis de las muestras

## II.3. Resultados

### II.3.1. Caseínas no sedimentables y proteínas de suero presentes en la fracción soluble de leche desnatada tratada con altas presiones

En la Figura 22 se muestra el contenido proteico total de los SU de las muestras de leche desnatada presurizada. El análisis estadístico reveló que el nivel de presión y el tipo de equipo (IR, PR y PL) influyeron significativamente ( $P < 0.01$ ) en la concentración de proteínas solubles y que existió interacción entre ambos factores.

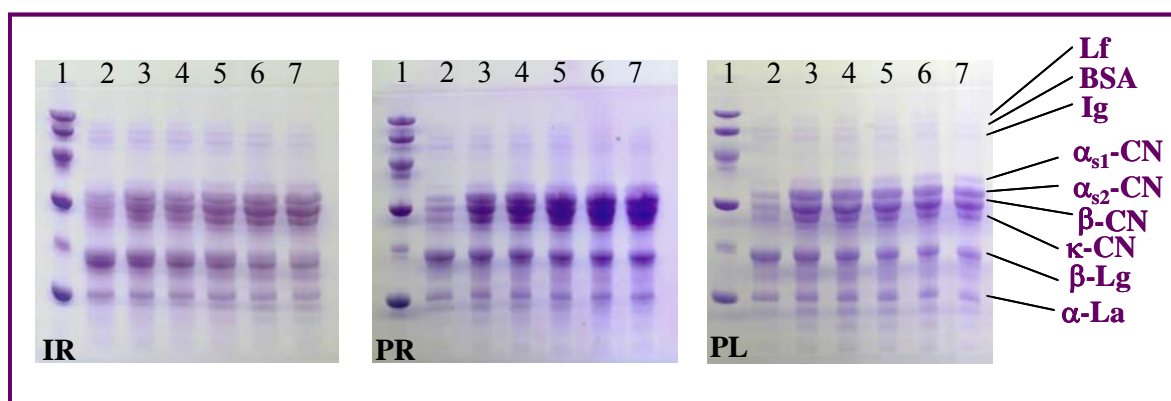
Los SU de las muestras de leche presurizadas en el equipo piloto (PR y PL) mostraron mayor contenido en proteína soluble que las tratadas en el equipo industrial (IR) a todos los niveles de presión estudiados ( $P < 0.01$ ). Los mayores contenidos en proteínas no sedimentables se encontraron a 550, 450 y 250 MPa tras los tratamientos IR, PR y PL, respectivamente.



**Figura 22.** Contenido proteico (g/L) de los sobrenadantes de ultracentrifugación obtenidos a partir de leche desnatada control (0.1 MPa) y de leche presurizada a 250, 350, 450, 550 y 650 MPa a 15°C durante 5 min, en un equipo industrial (IR) y en un equipo piloto con despresurización rápida (PR) y lenta (PL). Las barras representan los intervalos de confianza del 95%.

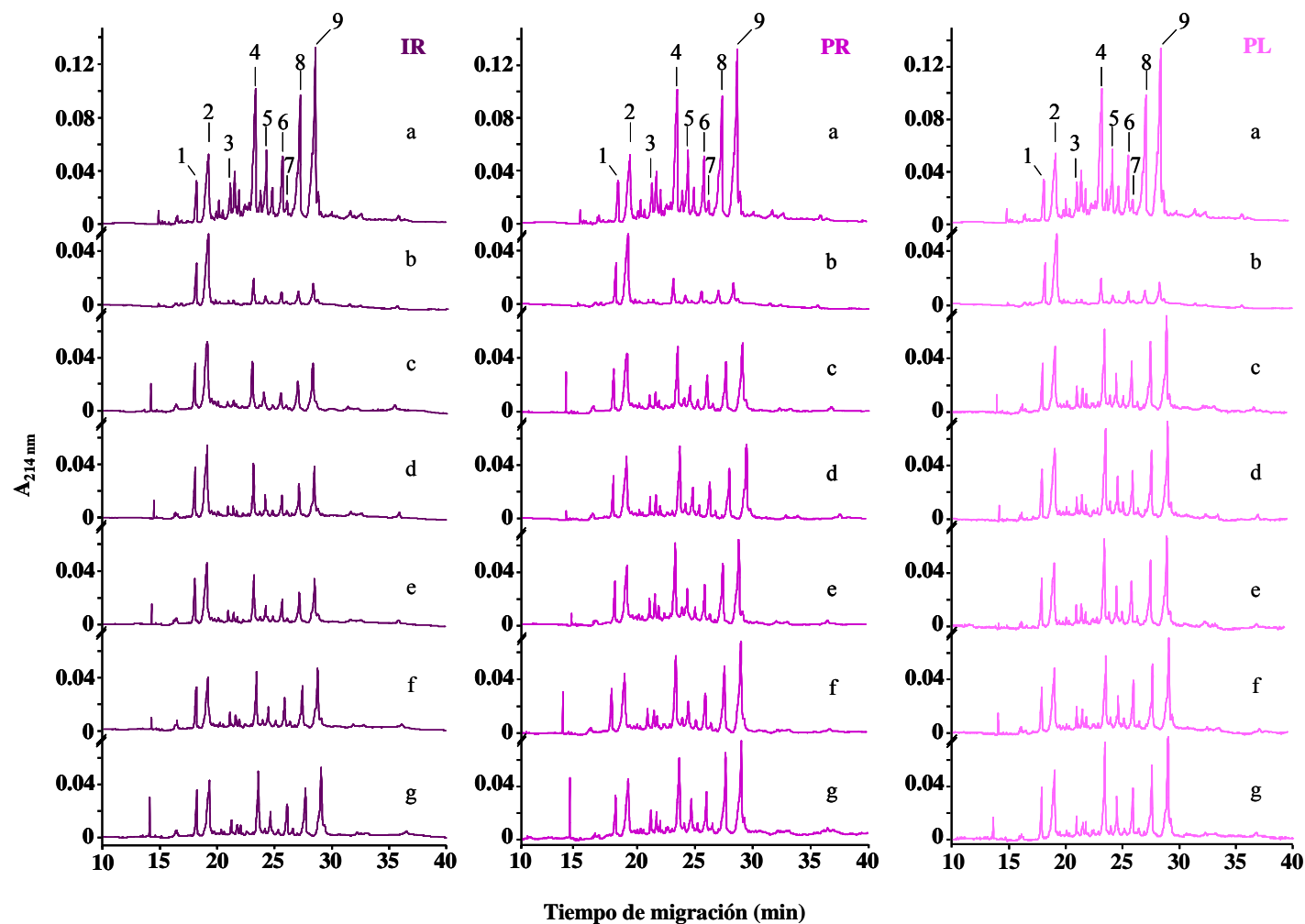


El estudio de los SU por PAGE-SDS permitió estimar cualitativamente la composición en proteínas individuales solubles en estas fracciones (Figura 33). Las bandas correspondientes a las caseínas en los sobrenadantes obtenidos a partir de leche presurizada (calles 3-7) en ambos equipos presentaron una intensidad mayor de color que el obtenido a partir de leche sin presurizar (calle 2), lo cual indica que la aplicación de presión hace que sea mucho mayor la liberación de caseínas a esta fracción. Este hecho corrobora el aumento en el contenido proteico total de estas muestras. Además, la intensidad de las bandas correspondientes a las caseínas aumentó ligeramente debido al aumento de la presión en el equipo industrial y piloto. Sin embargo, no se pudo comparar si este efecto fue similar en los 3 tratamientos IR, PR y PL debido a que la tinción de los geles se realizó en momentos diferentes y la intensidad del color pudo cambiar.



**Figura 23.** PAGE-SDS de los sobrenadantes obtenidos por ultracentrifugación de leche presurizada en un equipo industrial (IR) y en un equipo piloto con despresurización rápida (PR) y lenta (PL). Calles: 1: Marcador de pesos moleculares; 2 a 7: tratamiento de 0.1, 250, 350, 450, 550 y 650 MPa.

El análisis de las distintas proteínas individuales se realizó por electroforesis capilar. La Figura 24 muestra los electroforegramas obtenidos del análisis de los sobrenadantes de ultracentrifugación por esta técnica. En ellos se puede observar que el tratamiento con el equipo piloto a todas las presiones estudiadas produjo una mayor solubilización de caseínas comparado con el equipo industrial (proteínas marcadas como 4-9 en la Figura 24). Además, si se compara los dos tratamientos realizados en el equipo piloto, se produjo una mayor solubilización de caseínas con la despresurización lenta (PL) al menos a presiones de 250 y 350 MPa (Figura 24 c y d).



**Figure 24.** Electroforegramas de leche desnatada (a) y sobrenadantes de ultracentrifugación (SU) de: leche desnatada control (b) y leche presurizada a 250, 350, 450, 550 y 650 MPa (c-g) a 15°C durante 5 min, en un equipo industrial (IR) y en un equipo piloto con despresurización rápida (PR) y lenta (5 min, PL). 1:  $\alpha$ -La; 2:  $\beta$ -Lg; 3:  $\alpha_{s2}$ -CN; 4:  $\alpha_{s1}$ -CN; 5:  $\alpha_{s1}$ -CN 9P; 6:  $\kappa$ -CN; 7:  $\beta$ B-CN; 8:  $\beta$ A<sub>1</sub>-CN; 9:  $\beta$ A<sub>2</sub>-CN.

La cuantificación de las proteínas individuales observadas por EC permitió estudiar con más detalle el efecto de los tratamientos de presión aplicados en la liberación de caseínas individuales a la fase soluble (Tabla 6). Como ya se había indicado anteriormente, el tratamiento IR produjo una solubilización significativamente menor de todas las caseínas ( $P < 0.05$ ) que el tratamiento PR. Los niveles de  $\alpha_S$ -caseínas solubles ( $\alpha_{S1}$ -9P-,  $\alpha_{S1}$ - o  $\alpha_{S2}$ -CN), que en la leche control se correspondían con el 12.4-15% del contenido individual de cada proteína, aumentaron hasta el 17.3-29.6% y 34.1-45.2% después de los tratamientos IR y PR a 250 MPa, respectivamente, mientras que las  $\beta$ -caseínas ( $\beta A_1$ -,  $\beta A_2$ - o  $\beta$ -CN B) aumentaron del 10.5-18.4% (control) al 21.8-25.4 (IR) y 35.7-30.3% (PR). A esta presión (250 MPa), la  $\kappa$ -CN soluble supuso el 28.8 y 50.8% de su contenido en leche después de los tratamientos IR y PR, respectivamente. A mayores presiones, en términos generales, en el equipo industrial las caseínas no sedimentables aumentaron ligeramente o se estabilizaron a 350 y 450 MPa, observándose la máxima solubilización después de los tratamientos a 550 y 650 MPa. Esta tendencia fue similar en el equipo piloto con despresurización rápida, aunque en este caso, el contenido de caseínas no sedimentables alcanzó su máximo después de tratamientos de presión a 450 y 550 MPa.

Las proteínas de suero no sedimentables presentes en los SU, principalmente la  $\beta$ -Lg, disminuyeron gradualmente con el nivel de presión en ambos equipos (Figura 24 y Tabla 6). Esto explicaría la reducción del contenido total en proteína soluble observado a las presiones máximas (principalmente a 550 y 650 MPa después de los tratamientos IR y PR, respectivamente, Figura 22). Aunque el nivel de  $\beta$ -Lg disminuyó algo más lentamente después del tratamiento IR que después del PR, las diferencias no fueron significativas excepto a 350 MPa.

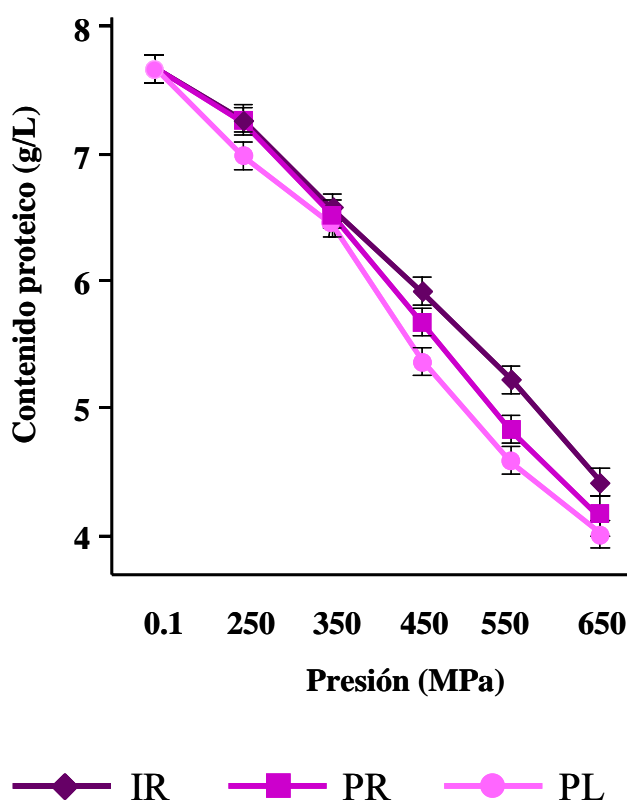
**Tabla 6.** Proteínas individuales presentes en los sobrenadantes de ultracentrifugación obtenidos a partir de leche desnatada control (0.1 MPa) y leche presurizada a 250, 350, 450, 550 and 650 MPa, a 15°C, durante 5 min, en un equipo industrial (IR) y un equipo piloto con despresurización rápida (PR) (los valores se representan como porcentaje del contenido individual de cada caseína en la leche cruda desnatada, estimado por EC).

Proteínas	Equipo alta presión	Presión (MPa)						SD total
		0.1	250	350	450	550	650	
$\alpha$ -La	IR	<sup>A</sup> 117.7 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 116.9 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 116.2 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 112.8 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 109.0 <sup>ab</sup>	<sup>A</sup> 94.9 <sup>a</sup>	4.0
	PR	<sup>A</sup> 117.7 <sup>c</sup>	<sup>A</sup> 107.4 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 99.6 <sup>ab</sup>	<sup>A</sup> 99.0 <sup>ab</sup>	<sup>A</sup> 101.3 <sup>ab</sup>	<sup>A</sup> 93.4 <sup>a</sup>	2.9
$\beta$ -Lg	IR	<sup>A</sup> 106.2 <sup>d</sup>	<sup>A</sup> 100.8 <sup>d</sup>	<sup>B</sup> 91.8 <sup>c</sup>	<sup>A</sup> 76.4 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 71.1 <sup>ab</sup>	<sup>A</sup> 65.48 <sup>a</sup>	2.4
	PR	<sup>A</sup> 106.2 <sup>d</sup>	<sup>A</sup> 93.3 <sup>c</sup>	<sup>A</sup> 77.5 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 70.3 <sup>ab</sup>	<sup>A</sup> 71.3 <sup>ab</sup>	<sup>A</sup> 63.6 <sup>a</sup>	2.6
$\alpha_{S2}$ -CN	IR	<sup>A</sup> 14.4 <sup>a</sup>	<sup>A</sup> 17.3 <sup>a</sup>	<sup>A</sup> 17.2 <sup>a</sup>	<sup>A</sup> 19.8 <sup>ab</sup>	<sup>A</sup> 28.4 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 29.3 <sup>b</sup>	1.5
	PR	<sup>A</sup> 14.4 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 34.1 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 39.7 <sup>c</sup>	<sup>B</sup> 46.2 <sup>de</sup>	<sup>B</sup> 50.8 <sup>e</sup>	<sup>B</sup> 43.5 <sup>cd</sup>	1.4
$\alpha_{S1}$ -CN	IR	<sup>A</sup> 12.4 <sup>a</sup>	<sup>A</sup> 24.1 <sup>bc</sup>	<sup>A</sup> 21.1 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 22.7 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 27.5 <sup>c</sup>	<sup>A</sup> 33.5 <sup>d</sup>	0.8
	PR	<sup>A</sup> 12.4 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 39.7 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 40.5 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 42.7 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 44.3 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 43.6 <sup>b</sup>	1.5
$\alpha_{S1}$ -CN 9P	IR	<sup>A</sup> 15.0 <sup>a</sup>	<sup>A</sup> 29.6 <sup>c</sup>	<sup>A</sup> 23.2 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 26.2 <sup>bc</sup>	<sup>A</sup> 30.3 <sup>cd</sup>	<sup>A</sup> 35.0 <sup>d</sup>	2.3
	PR	<sup>A</sup> 15.0 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 45.2 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 47.2 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 49.1 <sup>bc</sup>	<sup>B</sup> 57.4 <sup>c</sup>	<sup>B</sup> 46.0 <sup>bc</sup>	2.5
$\kappa$ -CN	IR	<sup>A</sup> 19.0 <sup>a</sup>	<sup>A</sup> 28.2 <sup>bc</sup>	<sup>A</sup> 24.9 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 28.5 <sup>c</sup>	<sup>A</sup> 36.4 <sup>d</sup>	<sup>A</sup> 39.2 <sup>d</sup>	1.0
	PR	<sup>A</sup> 19.0 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 50.8 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 51.5 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 55.1 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 56.3 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 55.8 <sup>b</sup>	2.1
$\beta$ -CN B	IR	<sup>A</sup> 18.4 <sup>a</sup>	<sup>A</sup> 25.4 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 23.6 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 23.1 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 30.5 <sup>c</sup>	<sup>A</sup> 34.2 <sup>c</sup>	1.0
	PR	<sup>A</sup> 18.4 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 37.0 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 42.1 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 42.2 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 46.0 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 39.3 <sup>b</sup>	2.2
$\beta$ A <sub>1</sub> -CN	IR	<sup>A</sup> 10.5 <sup>a</sup>	<sup>A</sup> 21.8 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 18.4 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 19.6 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 27.2 <sup>c</sup>	<sup>A</sup> 31.2 <sup>c</sup>	1.0
	PR	<sup>A</sup> 10.5 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 35.7 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 37.7 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 40.9 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 45.2 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 46.4 <sup>b</sup>	2.2
$\beta$ A <sub>2</sub> -CN	IR	<sup>A</sup> 13.5 <sup>a</sup>	<sup>A</sup> 25.2 <sup>c</sup>	<sup>A</sup> 22.6 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 22.9 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 30.1 <sup>c</sup>	<sup>A</sup> 34.9 <sup>c</sup>	1.7
	PR	<sup>A</sup> 13.5 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 39.3 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 41.0 <sup>bc</sup>	<sup>B</sup> 44.4 <sup>bc</sup>	<sup>B</sup> 46.6 <sup>bc</sup>	<sup>B</sup> 47.7 <sup>c</sup>	2.0

<sup>a-d</sup> Diferentes superíndices, a la derecha y en filas, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) producidas por el tratamiento de presión. <sup>A-B</sup> Diferentes superíndices, a la izquierda y en columnas para cada proteína, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) producidas por el equipo de alta presión. SD total: desviación estándar de los valores obtenidos para cada proteína a todas las presiones.

### II.3.2. Desnaturalización de las proteínas del suero en leche desnatada tratada por altas presiones

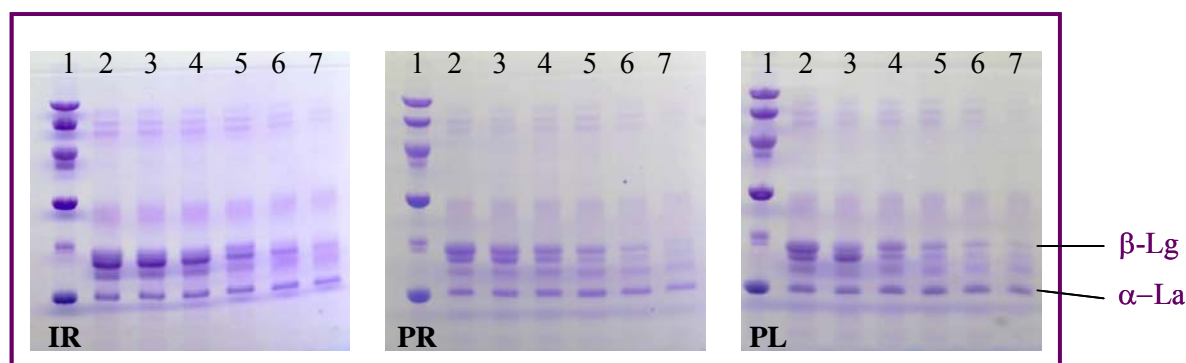
Los contenidos proteicos totales de las fracciones solubles a pH 4.6 de la leche desnatada presurizada se muestran en la Figura 25. En todos los tratamientos, la cantidad de proteína disminuyó significativamente con el nivel de presión ( $P < 0.01$ ) debido a la desnaturalización de las proteínas de suero. Se encontraron diferencias significativas entre ambos equipos, IR y PR, y el equipo piloto con despresurización lenta, PL, a presiones  $\geq 450$  MPa. La desnaturalización de proteínas siguió el orden:  $PL > PR > IR$ .



**Figura 25.** Proteína soluble a pH 4.6 (g/L) de leche control (0.1 MPa) y leche presurizada a 250, 350, 450, 550 y 650 MPa, a 15°C durante 5 min, en un equipo industrial (IR) y un equipo piloto con despresurización rápida (PR) y lenta (PL). Las barras representan un intervalo de confianza del 95%.

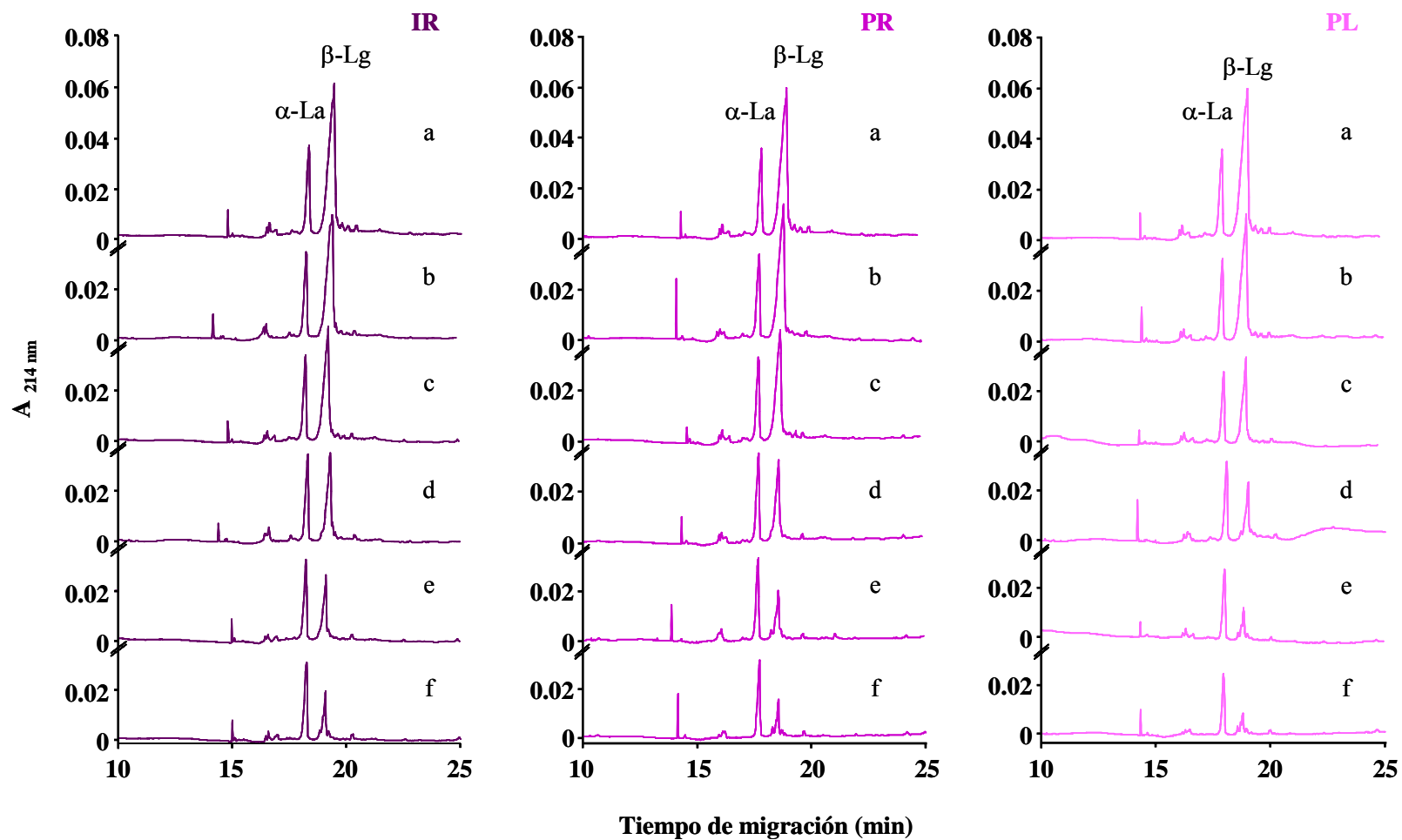
Mediante el análisis de estas fracciones por PAGE-SDS se pudo determinar con mayor precisión la causa de la disminución del contenido proteico por el aumento de la presión (Figura 26). En estas fracciones, y como era de esperar, las proteínas predominantes fueron las del suero. El aumento de la presión de 250 a 650 produjo una progresiva disminución del contenido de  $\beta$ -Lg soluble (calles 3-7), observado por la disminución de la intensidad de color

de la banda correspondiente a esta proteína. Lo cual indicó que la proteína se desnaturalizó y precipitó junto a las caseínas al descender el pH. En el caso de la  $\alpha$ -La, la intensidad de la banda no cambió de forma tan notable, observándose solamente una ligera disminución del color. Esta proteína fue mucho más resistente a la presión que la  $\beta$ -Lg.



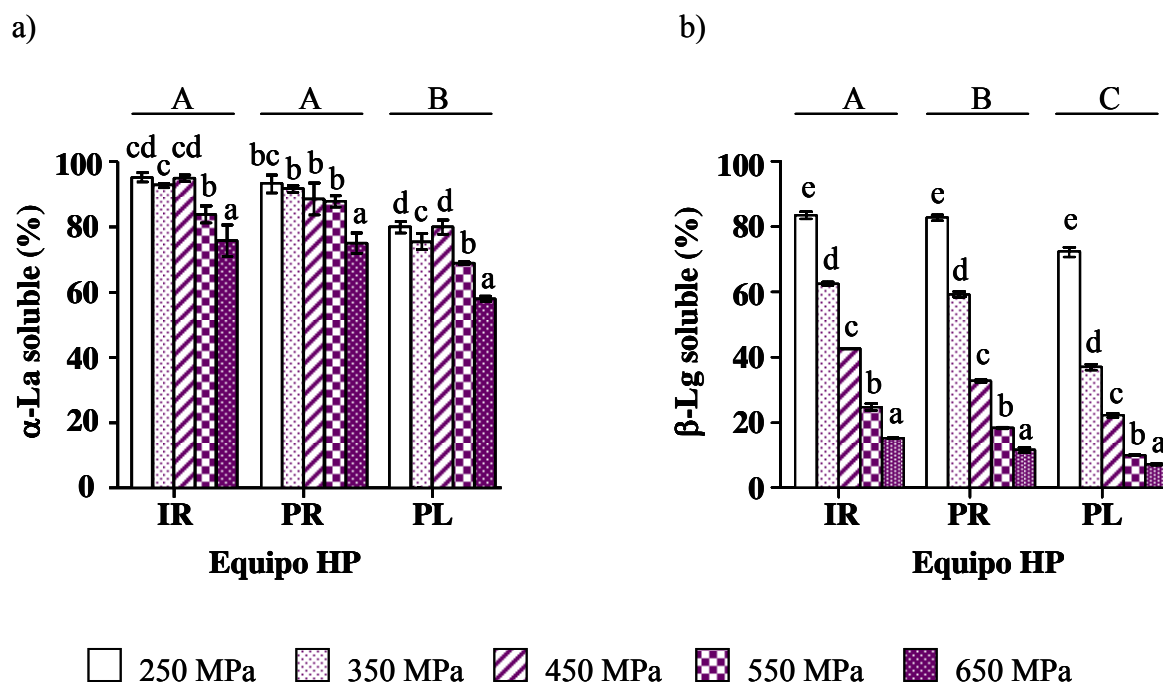
**Figura 2.6.** PAGE-SDS de las fracciones solubles a pH 4.6 de leche control (0.1 MPa) y leche presurizada a 250, 350, 450, 550 y 650 MPa, a 15°C durante 5 min, en un equipo industrial (IR) y un equipo piloto con despresurización rápida (PR) y lenta (PL). Calles: 1: Marcador de pesos moleculares; 2-7: tratamiento de 0.1, 250, 350, 450, 550 y 650 MPa.

El perfil electroforético de estas fracciones, obtenido por EC, corroboró el hecho de que la  $\beta$ -Lg fue más sensible a la presión que la  $\alpha$ -La, disminuyendo su contenido a medida que aumentó la presión (Figura 27). Además, en los electroforegramas también fue claramente visible que el tratamiento IR produjo una menor precipitación de la  $\beta$ -Lg que los tratamientos PR y PL y la comparación de los dos tratamientos realizados en el equipo piloto mostró que el contenido de  $\beta$ -Lg fue aún menor cuando se despresurizó de forma lenta (5 min).



**Figura 27.** Electroforegramas de las proteínas de suero (fracción soluble a pH 4.6) de leche desnatada y presurizada a 0, 250, 350, 450, 550 y 650 MPa (a-f) en equipo industrial con despresurización rápida (IR) y en equipo piloto con despresurización rápida (PR) y lenta (PL).

En la Figura 28 se muestra la cuantificación de la pérdida de solubilidad a pH 4.6 de las proteínas de suero individuales,  $\alpha$ -La y  $\beta$ -Lg medida por EC. Aproximadamente el 10% de la  $\alpha$ -La se desnaturizó después de los tratamientos IR y PR a presiones  $\geq 450$  MPa, aumentando al 25% a 650 MPa. La desnaturización de la  $\alpha$ -La fue significativamente mayor después de los tratamientos PL a similares niveles de presión, alcanzando el 40% a 650 MPa. La desnaturización de la  $\beta$ -Lg aumentó progresivamente con el nivel de presión ( $P < 0.01$ ), alcanzando, aproximadamente, el 90% a 650 MPa. Se observaron diferencias significativas entre los tres tipos de tratamientos a presiones  $\geq 350$  MPa ( $P < 0.01$ ). La desnaturización de la  $\beta$ -Lg, estimada por la pérdida de solubilidad a pH 4.6, se produjo en el orden: PL > PR > IR.

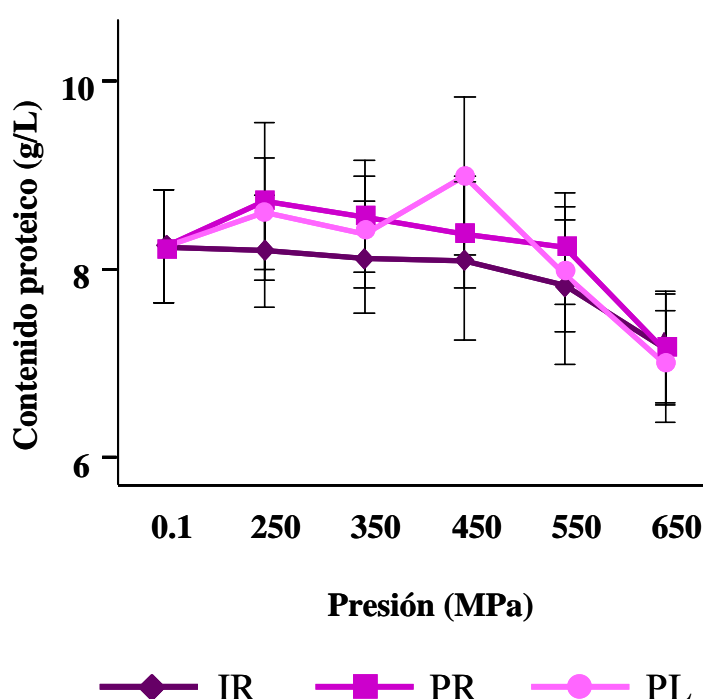


**Figura 28.** Contenido de  $\alpha$ -La y  $\beta$ -Lg solubles a pH 4.6, medido por CE, de leche presurizada a 250, 350, 450, 550 y 650 MPa, a 15°C durante 5 min en un equipo industrial (IR) y un equipo piloto con despresurización rápida (PR) y lenta (PL). Las barras representan la desviación estándar. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) debido al tipo de tratamiento (unidad de alta presión o velocidad de despresurización, IR, PR y PL), mientras que las letras minúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) debido al nivel de presión.



### II.3.3. Proteínas de suero desnaturizadas y no sedimentables en suero de ultracentrifugación tratado con altas presiones

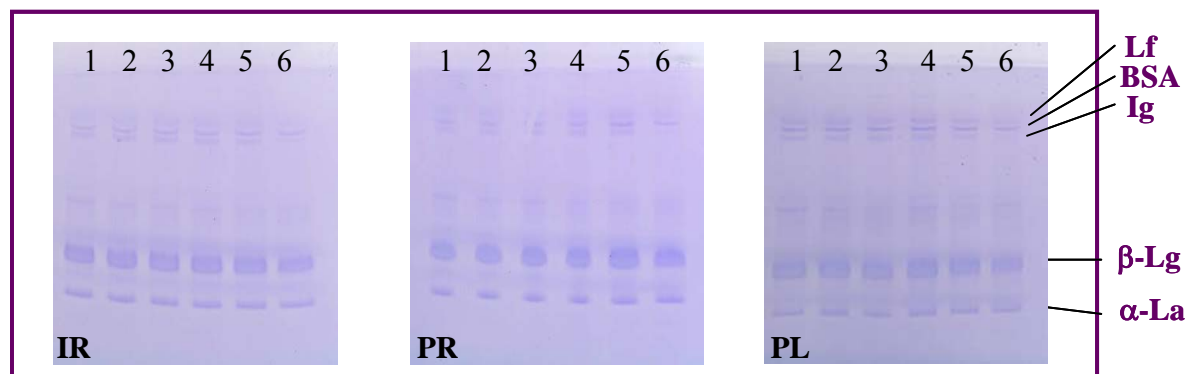
La Figura 29 muestra el contenido en proteína soluble de los SU presurizados. El tipo de equipo y la velocidad de despresurización en el equipo piloto no influyeron significativamente en la solubilidad de las proteínas de suero. En el equipo industrial y en el piloto, tanto con despresurización rápida como lenta, estos valores permanecieron constantes hasta 550 MPa, disminuyendo a 650 MPa ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, el contenido proteico de estas fracciones fue significativamente inferior a la de los sobrenadantes de SU de leche presurizada (Figura 22).



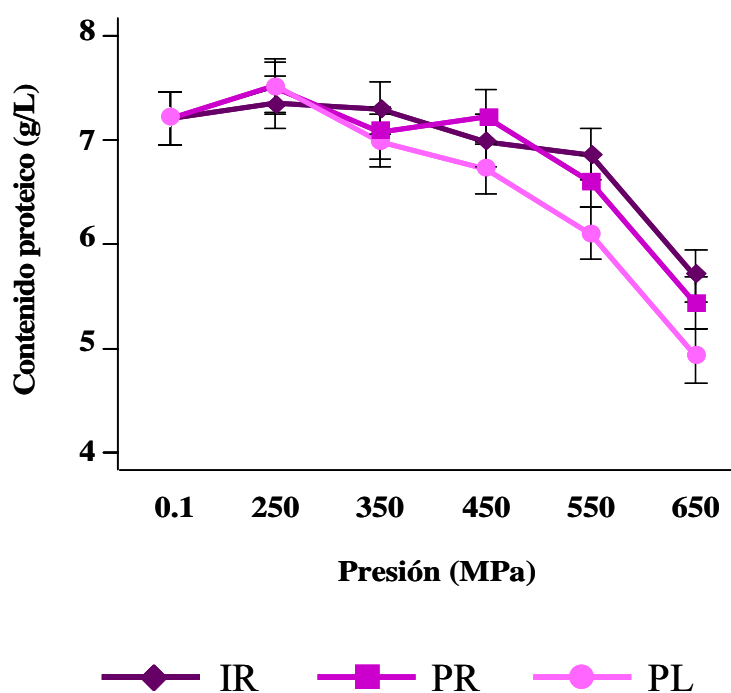
**Figura 29.** Contenido proteico (g/L) de los sobrenadantes de ultracentrifugación de leche desnatada, sin presurizar (0.1 MPa) y presurizados a 250, 350, 450, 550 y 650 MPa, a 15°C durante 5 min en un equipo industrial (IR) y un equipo piloto con despresurización rápida (PR) y lenta (PL). Las barras representan un intervalo de confianza del 95%.

El estudio más detallado de las proteínas integrantes de esta fracción por PAGE-SDS también mostró que el tratamiento de presión no produjo ningún efecto aparente sobre ninguna de las proteínas mayoritarias del suero,  $\beta$ -Lg y  $\alpha$ -La (Figura 30). Las bandas correspondientes a ambas proteínas no mostraron cambios en la intensidad del color, al menos, hasta 550 MPa aunque fue difícil de

determinar por simple observación. Por otro lado, también cabe indicar el reducido contenido en caseínas de esta fracción frente al de los SU de leche presurizada, de ahí el menor contenido proteico total indicado anteriormente.



**Figura 30.** PAGE-SDS de los sobrenadantes de ultracentrifugación de leche desnatada sin presurizar y presurizados a 250, 350, 450, 550 y 650 MPa, a 15°C durante 5 min en un equipo industrial (IR) y en un equipo piloto con despresurización rápida (PR) y lenta (PL). Calles: 1 a 6: tratamiento de 0.1, 250, 350, 450, 550 y 650 MPa.



**Figura 31.** Proteínas solubles a pH 4.6 (g/L) de los sobrenadantes de ultracentrifugación de leche desnatada, sin presurizar (0.1 MPa) y presurizados a 250, 350, 450, 550 y 650 MPa, a 15°C durante 5 min en un equipo industrial (IR) y un equipo piloto con despresurización rápida (PR) y lenta (PL). Las barras representan un intervalo de confianza del 95%.

Como se muestra en la Figura 31, el contenido en proteínas solubles a pH 4.6 empezó a disminuir a presiones  $\geq 350$  MPa. Se observaron diferencias significativas entre los dos equipos ( $P < 0.05$ ) y la velocidad de despresurización a presiones  $\geq 550$  MPa ( $P < 0.01$ ), siguiendo el orden  $PL > PR > IR$ .

## **II.4. Discusión**

### **II.4.1. Efecto del tipo de equipo de alta presión y de la velocidad de despresurización en la liberación de caseínas no sedimentables a la fase soluble de la leche**

Los resultados de este estudio mostraron que el tipo de equipo de alta presión y la velocidad de despresurización influyeron en la composición de las fracciones coloidales y solubles de la leche. El contenido en caseínas no sedimentables y la desnaturalización de las proteínas de suero aumentaron significativamente con el nivel de presión bajo las tres condiciones experimentales consideradas, aunque se encontraron diferencias entre el equipo industrial y piloto y entre los dos tiempos de despresurización ensayados.

Durante los tratamientos de leche con alta presión, la micela de caseína se desintegra debido a la ruptura de las interacciones electrostáticas intermoleculares y a la solubilización del fosfato cálcico coloidal (CCP) (Huppertz y De Kruif, 2006, 2007a). Medidas *in-situ* de la transmisión de la luz muestran que la ruptura de las micelas de caseína comienza a presiones de 100 MPa, aunque, a 250 y 300 MPa, a la desintegración inicial de las micelas que ocurre durante los primeros 5 min de tratamiento le sigue una progresiva agregación, debido a que, a estas presiones intermedias, se potencian las interacciones hidrofóbicas sobre la solvatación de los residuos hidrofóbicos (Huppertz y De Kruif, 2006; Huppertz y col., 2006b). Las micelas de caseína resultantes están más hidratadas y, se produce un aumento de las proteínas no sedimentables, posiblemente debido a la liberación fragmentos caseínicos o caseínas individuales, a presiones  $\geq 100$  MPa, tal y como se observó en este estudio (López-Fandiño y col., 1998; Huppertz y col., 2004b). Esto implica que el nivel de caseínas no sedimentables está inversamente correlacionado con el tamaño de la micela de caseína, excepto para las muestras agregadas a 250 y 300 MPa (Anema y col., 2005a).

En términos generales, observamos niveles de caseína soluble (Figuras 22 y 24) comparables a los publicados previamente para leche presurizada, con algunas diferencias que se pueden atribuir al uso de diferentes velocidades de ultracentrifugación (Anema y col., 2005a; Anema, 2008b). Normalmente, el máximo nivel de caseína soluble, que alcanza el 40 o 50% del total del contenido caseínico, se obtiene tras tratamientos a 300 MPa a 20°C durante 30 min (López-Fandiño y col., 1998; Huppertz y col., 2004b; Anema y col., 2005a; Anema, 2008b). En nuestro estudio, y tras los tratamientos con despresurización rápida -IR y PR-, los máximos niveles de proteínas no sedimentables se observaron a presiones superiores a las ya publicadas. Esta diferencia se podría atribuir al corto tiempo de tratamiento utilizado ya que, aunque la liberación de caseínas a la fase sérica es muy rápida durante los primeros 5 min de tratamiento, ésta continua aumentando gradualmente hasta los 60 min (Anema y col., 2005a; Anema, 2008b). Por otra parte, cuanto mayor es la presión, más rápida es la ruptura de la micela de caseína (Huppertz y col., 2006b).

En comparación con el tratamiento a escala piloto, el tratamiento a escala industrial condujo a un contenido en proteínas no sedimentables significativamente menor y la máxima liberación de caseínas a la fase soluble tuvo lugar a presiones más altas. Estas diferencias podrían atribuirse, al menos parcialmente, a las diferentes temperaturas de presurización alcanzadas en ambos sistemas. Durante la presurización, y asumiendo que la compresión es uniforme y que no existen pérdidas de calor, se produce un aumento de la temperatura del medio de presurización, que depende de diversos factores, como: el nivel de presión, el tiempo de mantenimiento, la composición del líquido transmisor de la presión, los materiales aislantes utilizados, etc. (Balasubramanian y Balasubramaniam, 2003; Buzrul y col., 2008; Knoerzer y col., 2010a, b). A medida que sube la presión, la temperatura aumenta por calentamiento adiabático, equilibrándose durante la fase de mantenimiento. En nuestras condiciones experimentales, se eligió un tiempo de tratamiento de 5 min para simular condiciones comerciales donde es muy importante el procesado de la mayor cantidad posible de producto. Posiblemente, ese tiempo de mantenimiento sea demasiado corto para la disipación de la temperatura alcanzada durante la etapa de subida de la presión, especialmente en el equipo a escala industrial con un volumen 150 veces mayor que el equipo a escala piloto (que a su vez estaba recubierto de una camisa de agua termostatzada a 15°C). Si bien esto habría dado lugar a una mayor temperatura efectiva durante los tratamientos a escala industrial (IR), la temperatura real fue superior en los tratamientos PR y PL. Así, por ejemplo,

se alcanzaron temperaturas aproximadamente unos 14°C superiores a 350 y 650 MPa, durante los tratamientos con el equipo piloto. Esto se debió a la utilización de aceite de silicona como fluido transmisor de la presión, que tiene mayor compresibilidad y menor calor específico y conductividad térmica que el agua (Balasubramanian y Balasubramaniam, 2003; Knoerzer y col., 2010a). La mayor temperatura alcanzada en los tratamientos a escala piloto reduciría la solubilidad del CCP y promovería las uniones hidrofóbicas, estabilizando las micelas de caseínas frente a la ruptura (Huppertz y col., 2006b). Sin embargo, los resultados existentes sobre el efecto de la temperatura en la desintegración de la micela de caseína indican que un aumento de la temperatura del tratamiento en el intervalo de 10 a 40°C causa una liberación más rápida de las caseínas al sobrenadante (Anema y col., 2005a). En cualquier caso, debe tenerse en cuenta que Anema y col. (2005a) observaron diferencias inferiores al 10%, tras tratamientos a 200-600 MPa durante 5 min, entre temperaturas de 30 y 40°C. Dado que, en nuestro caso las diferencias son mayores no podría descartarse un efecto adicional debido al tipo de equipo o al escalado (Tabla 6).

Respecto al efecto de la velocidad de despresurización, debe señalarse que los niveles de proteínas no sedimentables obtenidos después de los dos tratamientos en el equipo piloto, PR y PL fueron similares, aunque la liberación máxima de caseínas a la fase soluble se logró a presiones más bajas en el tratamiento PL (Figure 22). Esto sugiere que una despresurización lenta podría favorecer la desintegración de la micela. Previamente ya se había observado que, a presiones superiores a las que causan la liberación máxima de caseínas, el nivel de caseínas solubles tiende a disminuir, tal y como se ha observado en este estudio (Figura 22, 23 y 24, Tabla 6) (López-Fandiño y col., 1998; Huppertz y col., 2004b; Anema y col., 2005a). Esto podría deberse a una reagrupación parcial de las partículas micelares solubilizadas, puesto que para que se dé una reagrupación total que origine grandes agregados de caseína (como ocurre a presiones intermedias de 250-300 MPa) es necesario que la ruptura de la micela de caseína inducida por la presión no sea ni demasiado limitada ni demasiado profunda (Huppertz y De Kruif, 2006). Por otra parte, la disminución de la cantidad de sólidos solubles a 550 y 650 MPa (Figura 22) podría deberse, al menos en parte, a la pérdida de solubilidad de la  $\beta$ -Lg e incluso de la  $\alpha$ -La (Tabla 6 y Figura 24), explicando así, la reducción del contenido total de proteína no sedimentable en los SU.

### II.4.2 Influencia de la desnaturalización de las proteínas de suero

Los resultados obtenidos en los SU presurizados, que contenían proteínas de suero prácticamente en ausencia de micelas de caseína, indicaron que la presurización redujo tanto los niveles de proteínas solubles como los de proteínas nativas a presiones  $\geq 550$  MPa. Sin embargo, el examen de las fracciones solubles al pH normal de la leche y a pH 4.6 (Figuras 29, 30 y 31) indicó la existencia de proteínas de suero desnaturalizadas solubles. Comparativamente, la pérdida de solubilidad de la  $\alpha$ -La y de la  $\beta$ -Lg, tanto al pH normal de la leche como a pH 4.6, fue mucho más importante en la leche desnatada presurizada (Figuras 25, 26, y 27). Estos resultados corroboraron el hecho de que las proteínas de suero son más sensibles a la presión cuando están presentes en leche que en suero, puesto que, en el primer caso, estas proteínas podrían asociarse con las caseínas y precipitar con ellas en su punto isoeléctrico (Huppertz y col., 2004a, b). No obstante, en la leche presurizada, una importante proporción de las proteínas de suero desnaturalizadas también permaneció soluble al pH normal de la leche (Tabla 6), como ya habían descrito López-Fandiño y col. (1998) y Anema (2008b). Esto sugiere que las proteínas de suero desnaturalizadas solubles interaccionan entre sí o con las partículas de caseínas solubles liberadas durante la disgregación de la micela de caseína inducida por la presión, y no influyen en los cambios micelares producidos durante los tratamientos. A este respecto, aunque se ha sugerido que la asociación de las proteínas de suero desnaturalizadas con las micelas de caseína podría compensar la disminución del tamaño de la micela inducido por la presión (Huppertz y col., 2004a), experimentos de presurización de micelas de caseína en ausencia y presencia de proteínas de suero indicaron que la desnaturalización de las proteínas de suero no interfiere en la disociación o reasociación micelar (Gaucheron y col., 1997; Anema y col., 2005a; Huppertz y De Kruif, 2007b).

El grado de desnaturalización de las proteínas de suero depende del nivel de presión, el tiempo del tratamiento, el pH y la temperatura (López-Fandiño, 2006a). Sin embargo, este estudio también muestra que otros factores, como el tipo de equipo o la velocidad de despresurización, pueden influir en la desnaturalización de las seroproteínas, aunque sus efectos sólo fueron significativos a presiones  $\geq 350$  MPa aplicadas a la leche (Figura 25), o  $\geq 550$  MPa aplicadas a los SU (Figura 29). En el equipo industrial, a pesar de que se alcanzó una temperatura mayor durante el tratamiento, se observaron las menores desnaturalizaciones.

En el equipo a escala piloto, el tiempo más largo de despresurización (PL) aumentó la desnaturalización de las proteínas de suero frente al tiempo corto de despresurización (PR), pero la mayor desnaturalización de las proteínas de suero se produjo durante la fase de mantenimiento de la presión.

## **II.5. Conclusiones**

Los resultados obtenidos sugieren que los tratamientos con alta presión en los equipos estudiados, a escala industrial y piloto, producen diferentes distribuciones proteicas, pues conducen a diferentes grados de desintegración micelar con similares niveles de desnaturalización de las proteínas de suero. Si bien la presencia de caseína promovió la desnaturalización de las proteínas del suero, el grado de desnaturalización de las proteínas de suero no mostró ningún efecto en la ruptura micelar. Así, el equipo industrial condujo a una menor desintegración micelar que el equipo piloto, pero la mayoría de las proteínas de suero desnaturalizadas, unidas o no a las partículas de caseína no sedimentables, permanecieron solubles en ambos sistemas. La influencia de la velocidad de despresurización, descuidada en la mayoría de los estudios de alta presión, se tratará en más profundidad en el capítulo III.

### **CAPÍTULO III**

*Efecto de la velocidad de despresurización en la composición proteica de la fracción soluble de la leche*





### III.1. Introducción

Las micelas de caseína de la leche tratada con alta presión presentan propiedades diferentes a las de la leche cruda o calentada, relacionadas con su tamaño, número, composición e hidratación (Huppertz y col., 2006a; López-Fandiño, 2006a). El tratamiento con alta presión produce la desintegración de las micelas de caseína que, posteriormente, pueden volver a agregarse bajo ciertas condiciones. El grado de estos cambios depende de diferentes factores, tales como el nivel de presión, la duración del tratamiento, la temperatura, el contenido en calcio, el pH, etc (Arias y col., 2000; García-Risco y col., 2000; Huppertz y col., 2004a). Además, la alta presión también desnaturaliza a las proteínas de suero, que pueden asociarse con las micelas de caseína o con fragmentos micelares, existiendo varios estudios que han investigado la interacción de ambos fenómenos (Huppertz y col., 2004d; Anema y col., 2005a; Huppertz y De Kruif, 2007b).

Si bien se ha indicado que la velocidad de subida de la presión no tiene ningún efecto en las modificaciones producidas por la presión sobre las caseínas (Merel-Rausch y col., 2006), el efecto de la velocidad de liberación de la presión se ha ignorado en la mayoría de los estudios. Así, los resultados mostrados en el capítulo anterior indican que la velocidad de despresurización podría influir en la desintegración micelar y solubilización de las caseínas, así como en la desnaturalización de las proteínas de suero. Según Fertsch y col. (2003), la firmeza de los geles formados a partir de disoluciones de caseína micelar presurizadas a 600 MPa depende de la velocidad de descompresión, ya que las velocidades de despresurización más rápidas proporcionan geles más firmes y microestructuras más finas. Estos autores sugieren que, una vez que se produce la disociación de la micela de caseína durante la fase de mantenimiento de la presión, una despresurización lenta favorece el desarrollo de hiperestructuras caseínicas, debido a que los puentes de calcio y las interacciones hidrofóbicas se vuelven a formar, interfiriendo en una gelificación homogénea (Fertsch y col., 2003). Merel-Rausch y col. (2007) también encontraron geles de menor firmeza a velocidades lentas de liberación de la presión. En este caso, la viscosidad de disoluciones de caseína micelar tratadas a 400 y 600 MPa a 20 y 30°C con velocidades de despresurización rápidas, aumentó en un 5%, lo que se correlacionó con la formación de grandes estructuras flexibles, construidas a partir de micelas de caseína de menor tamaño. Así, las despresurizaciones rápidas (600 MPa/min) tenderían a diámetros hidrodinámicos grandes,

mientras que las lentas (20 MPa/min) disminuirían el diámetro, con respecto al de la leche control (Merel-Rausch y col., 2006). A este respecto, cabe indicar, además, que todavía no está clara la influencia de la desnaturalización de las proteínas de suero en la disociación y reagregación de las caseínas inducida por la presión (Huppertz y col., 2006a; López-Fandiño, 2006a).

A la vista de la importancia que tienen las propiedades fisicoquímicas de las proteínas de la leche en su aptitud tecnológica; el objetivo de este estudio fue el de profundizar en la influencia de la velocidad de despresurización sobre la distribución proteica entre las fracciones solubles y coloidales de la leche tratada con alta presión. Para llevar a cabo este propósito, se presurizó leche desnatada, con y sin agentes bloqueantes de grupos sulfhidrilo, a 250 y 350 MPa de 5 a 15 min a 25°C, aplicándole diferentes tiempos de despresurización entre 0.07 y 10 min. Se evaluó el grado de liberación de caseínas a la fase soluble y la influencia de la desnaturalización de las proteínas de suero en este proceso.

## **III.2. Materiales y Métodos**

La Figura 32 resume el procedimiento experimental seguido en este trabajo.

### **III.2.1. Preparación de las muestras**

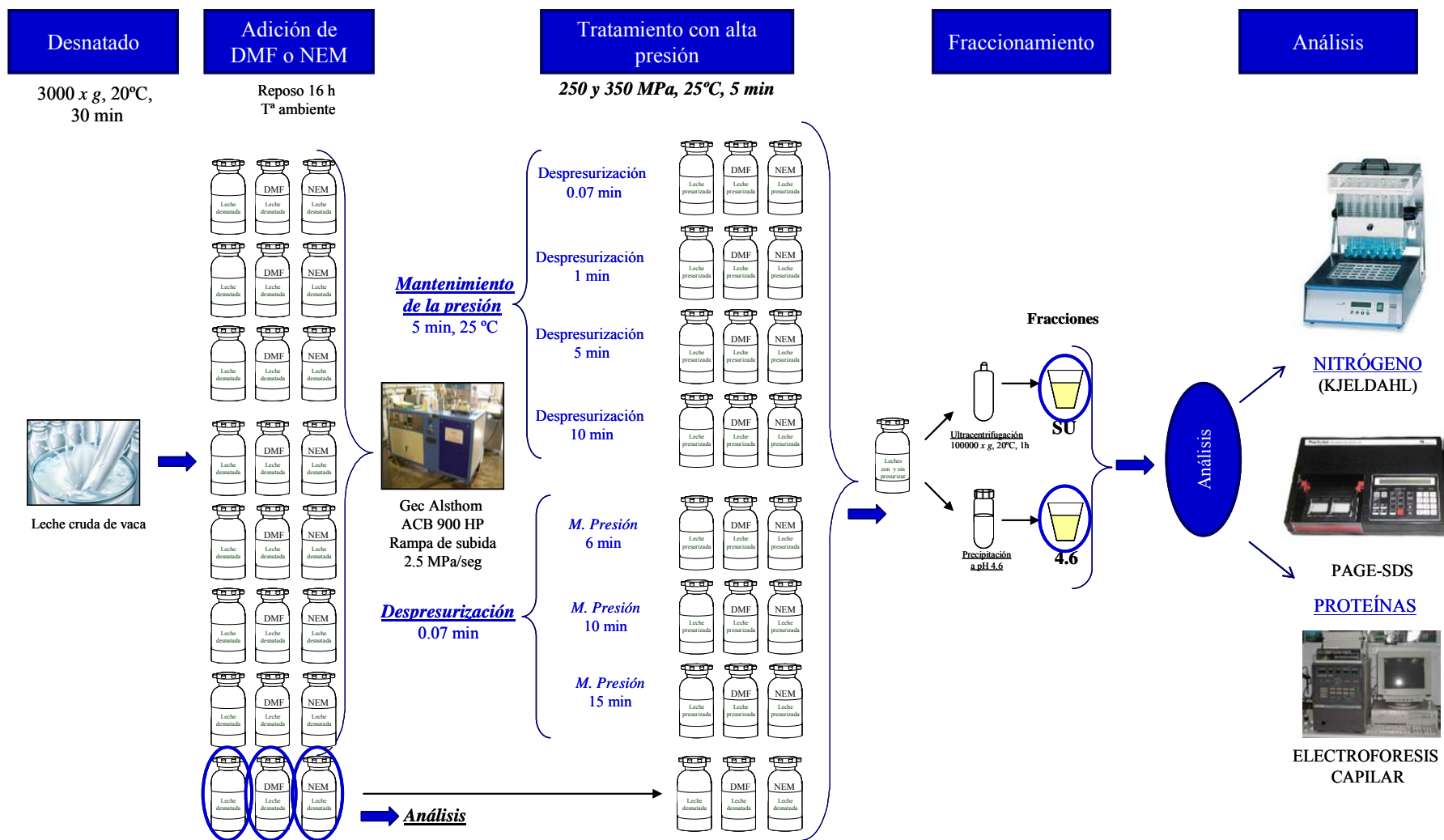
La leche cruda de vaca se obtuvo de una granja local y se desnató calentándola a 37°C durante 30 min y centrifugándola a 3000 x g, 20°C durante 30 min. Una parte de la leche desnatada se trató con N-etilmaleimida (NEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), siguiendo el método descrito por Needs y col. (2000b), con el fin de bloquear los grupos sulfhidrilo de la proteína, implicados en la desnaturalización de las proteínas de suero. El NEM es insoluble en agua por lo que se disolvió en dimetilformamida (DMF; Lab-Scan, Gliwice, Poland) a una concentración de 20 mg/mL y se añadió, a la leche desnatada, 16.7 mL/L de esta disolución. Se usaron, como controles, muestras de leche con el mismo volumen de DMF sin NEM. Tanto las muestras con DMF como con NEM se dejaron a temperatura ambiente toda la noche antes de los tratamientos con alta presión.

### **III.2.2. Tratamientos de alta presión**

Se realizaron presurizaciones a 250 y 350 MPa, 25°C durante 5 min de leche desnatada, leche desnatada con NEM y leche desnatada con DMF. Para ello, las muestras se dispensaron en botes de polietileno de 70 mL, llenándolos hasta arriba para no dejar espacio libre en su interior y se introdujeron en un equipo de alta presión ACB 900 HP (Eurotherm Automation, Lyon, France) el cual utiliza agua como fluido transmisor de la presión.

Para evaluar el efecto de la duración del tratamiento, la presión se elevó a una velocidad de 2.5 MPa/seg, manteniéndose durante 5, 6, 10 o 15 min, y se liberó en 0.07 min (4 seg), esto es, a una velocidad de despresurización de 62.5 y 87.5 MPa/seg, para los tratamientos de 250 y 350 MPa, respectivamente.

Por otro lado, para evaluar el efecto de la despresurización, la presión se elevó a una velocidad de 2.5 MPa/seg, manteniéndose durante 5 min, y se liberó en 0.07, 1, 5 o 10 min, esto es, para los tratamientos de 250 MPa, las velocidades de despresurización fueron 62.5, 4.2, 0.8 o 0.4 MPa/seg y, para 350 MPa, 87.5, 5.8, 1.2 o 0.6 MPa/seg, respectivamente (Figura 32). En adelante, y con el fin de simplificar la presentación de los resultados, se utilizarán los tiempos de despresurización como indicadores de las diferentes velocidades de despresurización. Todos los tratamientos con alta presión se realizaron al menos por duplicado.



**Esquema 1.** Esquema de la preparación, tratamientos con alta presión, fraccionamiento y análisis de las muestras

### **III.3. Resultados**

#### **III.3.1. Solubilización de caseínas y desnaturalización de proteínas del suero en leche desnatada tratada por altas presiones**

Se determinó el contenido de proteínas no sedimentables y de proteínas solubles a pH 4.6 de la leche tratada con altas presiones a 250 y 350 MPa. La Tabla 7 muestra el efecto del tiempo de mantenimiento de la presión con 0.07 min de despresurización y el efecto del tiempo de despresurización con 5 min de mantenimiento de la presión.

A 250 MPa, los niveles de proteínas no sedimentables encontrados en los SU de leche presurizada con tiempos de mantenimiento de la presión  $< 15$  min fueron similares a los de la leche control, mientras que, a 350 MPa, aumentaron significativamente con tiempos de mantenimiento  $\geq 5$  min (Tabla 7). Los contenidos en proteínas de suero solubles a pH 4.6 disminuyeron significativamente después de 5 min a 250 y 350 MPa, y el mantenimiento de la presión a 350 MPa hasta 15 min también los redujo significativamente ( $P < 0.05$ ).

En comparación con la despresurización más rápida (0.07 min), el aumento del tiempo de despresurización (de 1 a 10 min) aumentó significativamente los niveles de proteína no sedimentable a ambos niveles de presión y, especialmente, a 350 MPa (Tabla 7). Los tratamientos con una duración total de 15 min a 250 MPa y de 10 y 15 min a 350 MPa produjeron contenidos de proteínas solubles significativamente mayores cuando el tiempo de mantenimiento de la presión fue de 5 min, con 5 y 10 min de despresurización, que cuando los tiempos de mantenimiento de la presión fueron de 10 y 15 min, respectivamente, con 0.07 min de despresurización (valores marcados con \* en la Tabla 7). Sin embargo, los tiempos de despresurización y de mantenimiento de la presión ejercieron una influencia similar en los contenidos de proteínas en la fracción soluble a pH 4.6 después tratamientos a 250 y 350 MPa. Como era de esperar, la presurización durante 5 min, a ambas presiones, produjo una disminución significativa del contenido proteico de esta fracción ( $P < 0.05$ ) que fue disminuyendo ligeramente con el aumento de la duración del tratamiento a ambas presiones aunque estos cambios no fueron significativamente diferentes. No obstante, el contenido en proteínas solubles fue menor en todos los tratamientos realizados a 350 MPa respecto a los mismos a 250 MPa (Tabla 7).

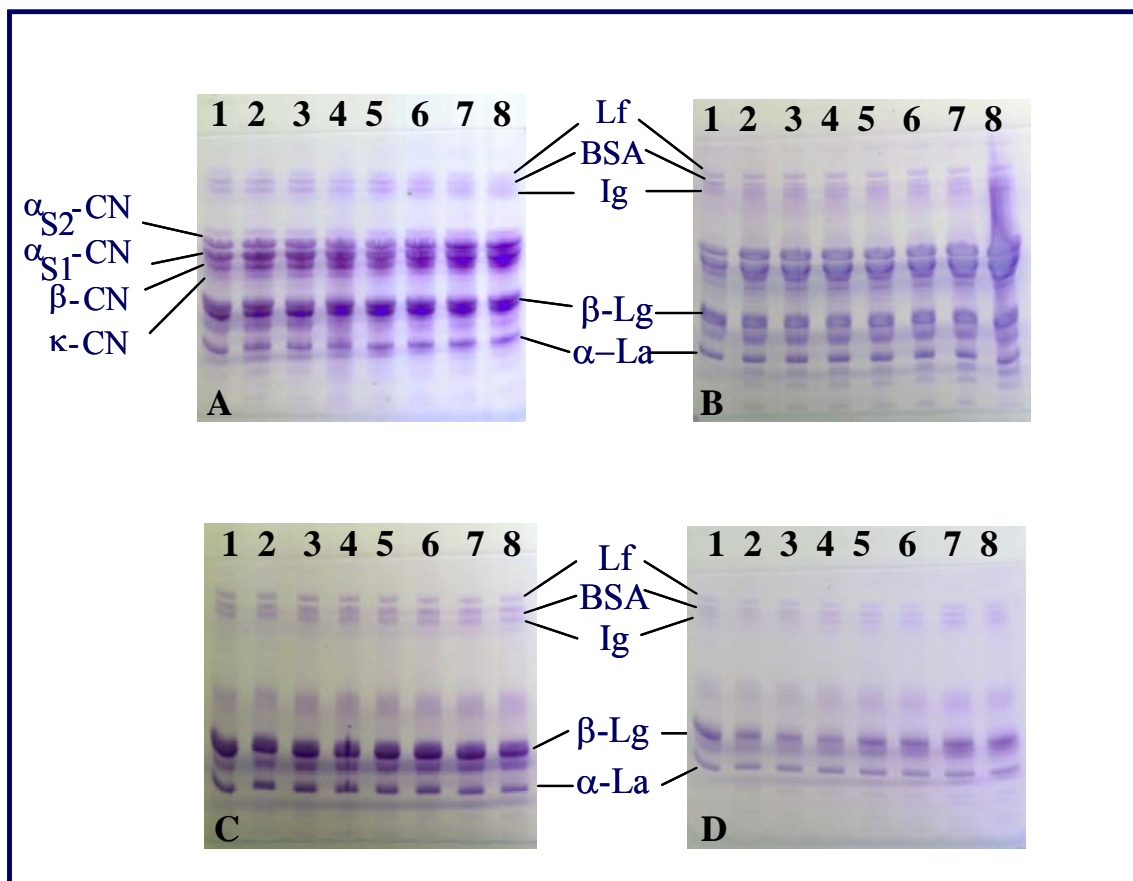
**Tabla 7.** Contenidos en proteínas (g/L  $\pm$  desviación estándar) de los sobrenadantes de ultracentrifugación (SU) y de las fracciones soluble a pH 4.6 (4.6) de la leche desnatada control (0 min de tiempo de mantenimiento de la presión y de despresurización) y leche presurizada a 250 y 350 MPa y 25°C a diferentes tiempos de mantenimiento y despresurización.

Tiempo de mantenimiento (min)	Tiempo de despresurización (min)	250 MPa		350 MPa	
		SU	4.6	SU	4.6
0	0	12.05 <sup>bD</sup> $\pm$ 0.01	8.07 <sup>aA</sup> $\pm$ 0.02	12.05 <sup>dE</sup> $\pm$ 0.01	8.07 <sup>aA</sup> $\pm$ 0.02
5	0.07	12.00 <sup>bD</sup> $\pm$ 0.08	7.79 <sup>bB</sup> $\pm$ 0.06	14.88 <sup>cD</sup> $\pm$ 0.08	7.24 <sup>bB</sup> $\pm$ 0.04
6	0.07	12.83 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.10	7.85 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.38	15.24 <sup>b</sup> $\pm$ 0.10	7.22 <sup>b</sup> $\pm$ 0.02
10	0.07	12.93 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.88	8.06 <sup>a</sup> $\pm$ 0.01	*16.16 <sup>a</sup> $\pm$ 0.01	6.93 <sup>c</sup> $\pm$ 0.11
15	0.07	*13.30 <sup>a</sup> $\pm$ 0.29	8.32 <sup>a</sup> $\pm$ 0.15	*16.24 <sup>a</sup> $\pm$ 0.05	6.86 <sup>c</sup> $\pm$ 0.10
5	1	13.06 <sup>C</sup> $\pm$ 0.20	7.71 <sup>B</sup> $\pm$ 0.08	15.65 <sup>C</sup> $\pm$ 0.10	7.36 <sup>B</sup> $\pm$ 0.10
5	5	14.19 <sup>B</sup> $\pm$ 0.01	7.65 <sup>B</sup> $\pm$ 0.10	*17.32 <sup>B</sup> $\pm$ 0.31	7.26 <sup>B</sup> $\pm$ 0.11
5	10	*14.62 <sup>A</sup> $\pm$ 0.11	7.41 <sup>C</sup> $\pm$ 0.06	*18.44 <sup>A</sup> $\pm$ 0.30	7.17 <sup>B</sup> $\pm$ 0.06

<sup>a-d</sup> Diferentes superíndices en letras minúsculas, en columnas, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) producidas por el tiempo de mantenimiento de la presión. <sup>A-E</sup> Diferentes superíndices en letras mayúsculas, en columnas, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) producidas por el tiempo de despresurización. \* Indica diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre valores correspondientes al mismo tiempo total de tratamiento con diferentes combinaciones de tiempo de mantenimiento y de despresurización a cada nivel de presión.

El análisis de los sobrenadantes de ultracentrifugación y de las fracciones solubles a pH 4.6 por PAGE-SDS se muestran en la Figura 33, el cual reveló que el contenido en caseínas no sedimentables en los sobrenadantes de ultracentrifugación aumentó con el aumento del tiempo de despresurización (Figura 33, A y B, calles 5-8). Este hecho justifica el incremento en el contenido proteico total observado anteriormente (Tabla 7). Además, la intensidad de las bandas correspondientes a las caseínas en los sobrenadantes de

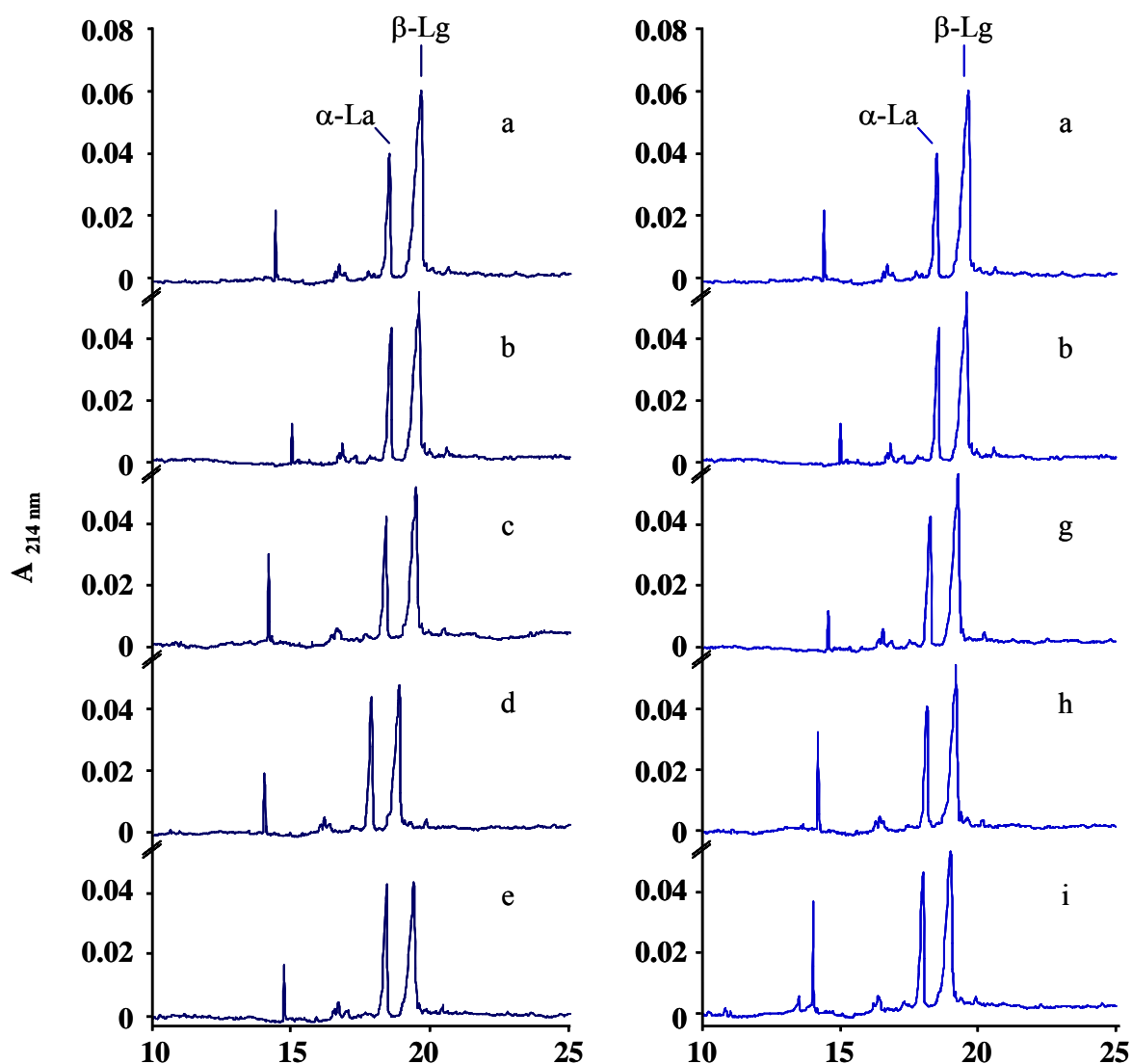
ultracentrifugación (Figura 33 A y B) y de  $\beta$ -Lg en la fracción soluble a pH 4.6 (Figura 33 C y D) con tratamientos de presión de 6, 10 y 15 min fue menor que las de los tratamientos de presión de 5 min con despresurización de 1, 5 y 10 min.



**Figura 33.** PAGE-SDS de los sobrenadantes de ultracentrifugación (A, B) y de las fracciones solubles a pH 4.6 (C, D) de leche presurizada a 250 (A, C) y 350 MPa (B, D), 25°C durante diferentes tiempos. Calles: 1: SU (en A y B) o fracción soluble a pH 4.6 (en C y D) de leche control; 2-4: tratamiento de presurización de 6, 10 y 15 min con despresurización de 0.07 min. 5-8: tratamiento de presurización de 5 min con despresurización de 0.07, 1, 5 y 10 min

Las fracciones solubles a pH 4.6 de leche tratada a 250 y 350 MPa también se analizaron por electroforesis capilar. A modo de ejemplo, en la Figura 34 se muestran los electroforegramas obtenidos del análisis de las fracciones solubles a pH 4.6 de leche presurizada a 350 MPa.

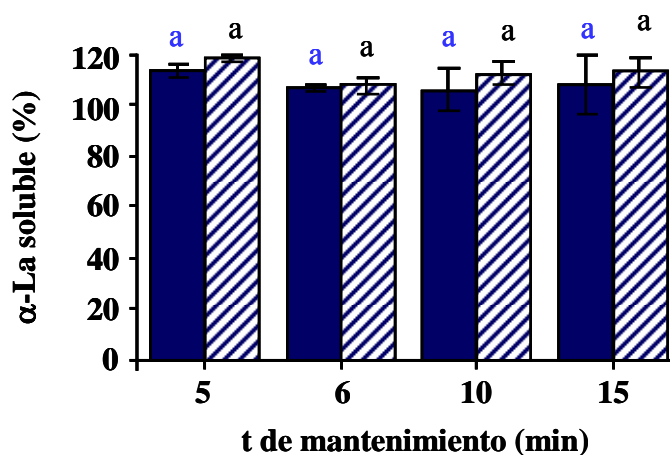




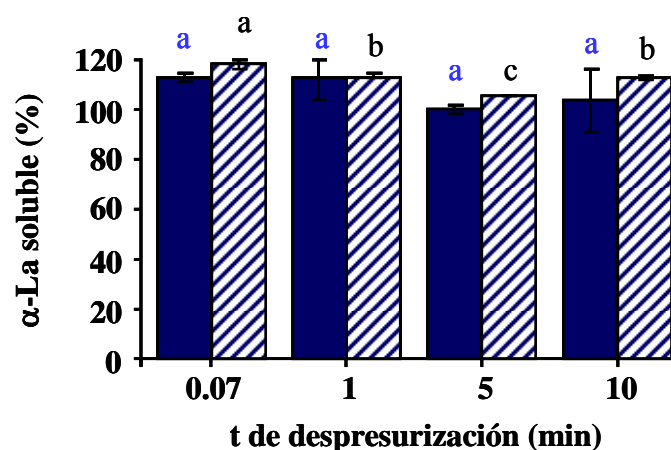
**Figura 34.** Electroforegramas de las fracciones solubles a pH 4.6 de leche desnatada control (a) y presurizada a 350 MPa y 25°C durante 5 con despresurización en 0.07 min (b). d-e muestran el efecto del tiempo de mantenimiento de la presión (6, 10 y 15 min seguidos de 0.07 min de despresurización, respectivamente) y f-i el efecto del tiempo de despresurización (5 minutos de mantenimiento seguidos de 1, 5 y 10 min de despresurización, respectivamente)

Los contenidos individuales de  $\alpha$ -La y  $\beta$ -Lg presentes en estas fracciones (4.6) mostraron que, tanto a 250 como a 350 MPa, el tiempo de mantenimiento de la presión no influyó en la desnaturalización de la  $\alpha$ -La a ninguna de las presiones estudiadas (Figura 35 a). Sin embargo, a 350 MPa, el aumento del tiempo de despresurización de 0.07 a 1 min produjo una disminución del ---- en el contenido soluble de esta proteína aunque no disminuyó más por efecto de la prolongación de la despresurización hasta los 10 min.

a)



b)

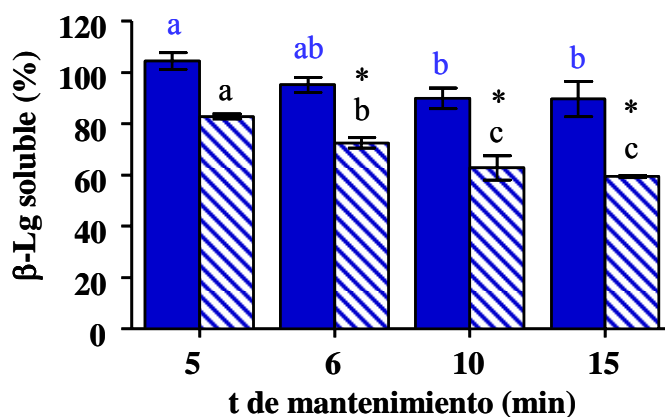


**Figura 35.** Contenido en  $\alpha$ -La soluble a pH 4.6, medido por EC, de leche presurizada a 250 (■) y 350 MPa (▨). Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras en el mismo color indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) producidas por el tiempo de mantenimiento de la presión (a) o de despresurización (b) a 250 y 350 MPa. \* Indica diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), entre valores correspondientes al mismo tiempo total de tratamiento, entre las figuras a y b.

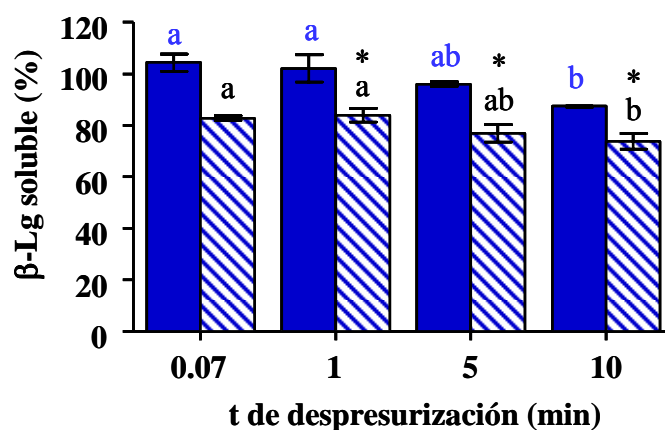
En el caso de la  $\beta$ -Lg, el tiempo de mantenimiento de la presión sí contribuyó a la desnaturalización de esta proteína, especialmente a 350 MPa (Figura 36a). Además, la desnaturalización de la  $\beta$ -Lg fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) después de tiempos de mantenimiento de 6, 10 o 15 min, seguidos por una despresurización de 0.07 min, que

después de tiempos de mantenimiento de la presión de 5 min seguidos por despresurizaciones de 1, 5 o 10 min (Figura 36 a y b).

a)



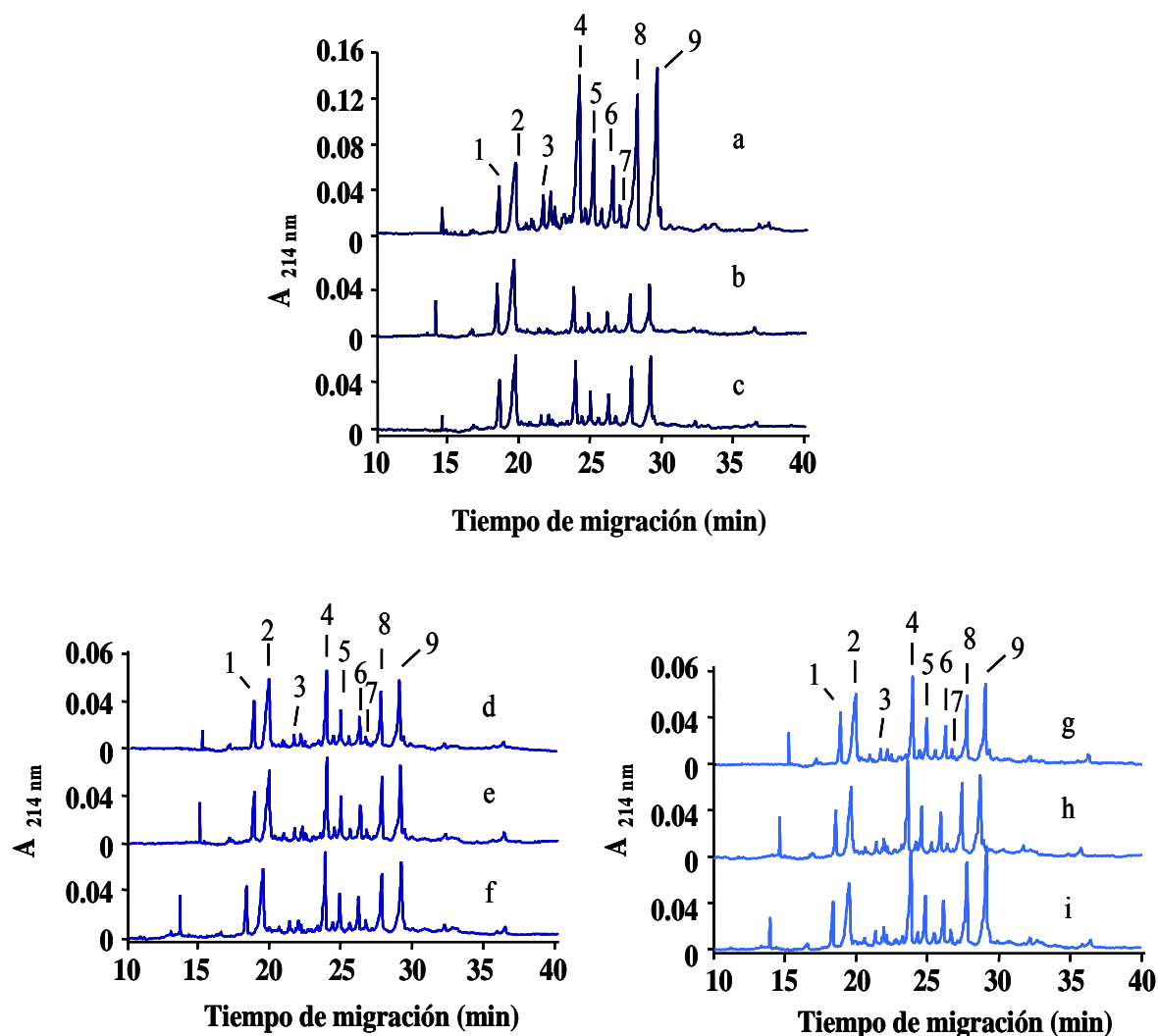
b)



**Figura 36.** Contenido en  $\beta$ -Lg soluble a pH 4.6, medido por EC, de leche presurizada a 250 (■) y 350 MPa (▨). Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras en el mismo color indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) producidas por el tiempo de mantenimiento de la presión (a) o de despresurización (b) a 250 y 350 MPa. \* Indica diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), entre valores correspondientes al mismo tiempo total de tratamiento, entre las figuras a y b.

También se analizaron los sobrenadantes de ultracentrifugación por EC, mostrándose a modo de ejemplo en la Figura 37 los electroforegramas de los SU de leche presurizada a 350 MPa. A tiempos de tratamiento totales equivalentes, los niveles individuales de todas la

mayoría de las caseínas fueron significativamente ( $P < 0.05$ ) superiores tras tratamientos de 5 min a 250 y 350 MPa seguidos por una despresurización de 5 y 10 min que cuando la leche se sometió a cada nivel de presión durante 10 y 15 min, pero no se observaron diferencias entre los niveles de  $\alpha$ -La o  $\beta$ -Lg (Tabla 8 y 9, Figura 37).



**Figura 37.** Electroforegramas de leche desnatada control (a) y sobrenadantes de ultracentrifugación de: leche desnatada control (b) y leche presurizada a 350 MPa y 25°C durante 5 min con despresurización en 0.07 min (c). d-f muestran el efecto del tiempo de mantenimiento de la presión (6, 10 y 15 min seguidos de 0.07 min de despresurización, respectivamente) y g-i el efecto del tiempo de despresurización (5 minutos de mantenimiento seguidos de 1, 5 y 10 min de despresurización, respectivamente) 1:  $\alpha$ -La; 2:  $\beta$ -Lg; 3:  $\alpha_{s2}$ -CN; 4:  $\alpha_{s1}$ -CN; 5:  $\alpha_{s1}$ -CN 9P; 6:  $\kappa$ -CN; 7:  $\beta$ B-CN; 8:  $\beta$ A<sub>1</sub>-CN; 9:  $\beta$ A<sub>2</sub>-CN.

**Tabla 8.** Proteínas individuales presentes en los sobrenadantes de ultracentrifugación (SU) obtenidos a partir de leche desnatada control (0 min de tiempo de mantenimiento de la presión y de despresurización) y leche presurizada a 250 MPa, a 25°C, durante 5 min, (los valores se representan como porcentaje del contenido individual de cada caseína en la leche cruda desnatada, estimado por EC).

Tiempo de mantenimiento (min)	Tiempo de despresurización (min)	$\alpha$ -La	$\beta$ -Lg	$\alpha_{S2}$ -CN	$\alpha_{S1}$ -CN	$\alpha_{S0}$ -CN	$\kappa$ -CN	$\beta$ -CN B	$\beta$ A <sub>1</sub> -CN	$\beta$ A <sub>2</sub> -CN
0	0	107.93 <sup>aA</sup>	101.34 <sup>aA</sup>	15.05 <sup>aB</sup>	13.30 <sup>cD</sup>	14.96 <sup>cD</sup>	23.19 <sup>aC</sup>	28.88 <sup>aC</sup>	16.98 <sup>bD</sup>	21.39 <sup>bD</sup>
5	0.07	108.47 <sup>aA</sup>	96.24 <sup>aA</sup>	15.78 <sup>aB</sup>	17.09 <sup>bCD</sup>	20.70 <sup>abC</sup>	26.57 <sup>aBC</sup>	23.16 <sup>aC</sup>	17.15 <sup>bD</sup>	19.20 <sup>cE</sup>
6	0.07	102.96 <sup>a</sup>	93.93 <sup>a</sup>	17.41 <sup>a</sup>	20.00 <sup>a</sup>	22.49 <sup>a</sup>	30.12 <sup>a</sup>	32.72 <sup>a</sup>	21.82 <sup>a</sup>	23.99 <sup>a</sup>
10	0.07	105.97 <sup>a</sup>	93.74 <sup>a</sup>	18.24 <sup>a</sup>	*17.74 <sup>b</sup>	*19.28 <sup>b</sup>	*28.91 <sup>a</sup>	30.54 <sup>a</sup>	*19.37 <sup>ab</sup>	*23.59 <sup>a</sup>
15	0.07	98.91 <sup>a</sup>	90.72 <sup>a</sup>	21.52 <sup>a</sup>	*16.57 <sup>b</sup>	*17.74 <sup>bc</sup>	*27.51 <sup>a</sup>	25.43 <sup>a</sup>	*18.52 <sup>b</sup>	*21.14 <sup>b</sup>
5	1	96.59 <sup>A</sup>	91.00 <sup>A</sup>	18.77 <sup>AB</sup>	18.38 <sup>C</sup>	20.91 <sup>C</sup>	31.93 <sup>B</sup>	27.45 <sup>BC</sup>	20.17 <sup>C</sup>	23.05 <sup>C</sup>
5	5	96.91 <sup>A</sup>	93.05 <sup>A</sup>	19.45 <sup>AB</sup>	*24.11 <sup>B</sup>	*26.62 <sup>B</sup>	*37.96 <sup>A</sup>	33.26 <sup>AB</sup>	*24.65 <sup>B</sup>	*27.99 <sup>B</sup>
5	10	109.36 <sup>A</sup>	101.56 <sup>A</sup>	26.01 <sup>A</sup>	*29.31 <sup>A</sup>	*33.10 <sup>A</sup>	*46.62 <sup>A</sup>	35.23 <sup>A</sup>	*30.71 <sup>A</sup>	*31.23 <sup>A</sup>
<sup>1</sup> SD total		3.65	3.28	2.34	0.57	0.86	2.51	3.18	0.71	0.33
<sup>2</sup> SD total		3.52	3.46	2.66	1.18	1.22	1.54	1.66	0.60	0.29

<sup>a-c</sup> Diferentes superíndices en letras minúsculas, en columnas, indican diferencias significativas (P< 0.05) producidas por el tiempo de mantenimiento de la presión. <sup>A-E</sup> Diferentes superíndices en letras mayúsculas, en columnas, indican diferencias significativas (P< 0.05) producidas por el tiempo de despresurización. \* Indica diferencias significativas (P< 0.05) entre valores correspondientes al mismo tiempo total de tratamiento, con diferentes combinaciones de tiempo de mantenimiento y de despresurización a cada nivel de presión. <sup>1</sup> SD total de los valores correspondientes a los SU de leche control y leche presurizada durante 5, 6, 10 y 15 min y despresurizada en 0.07 min. <sup>2</sup> SD total de los valores correspondientes a los SU de leche control y leche presurizada durante 5 min y despresurizada en 0.07, 1, 5 y 10 min.

**Tabla 9.** Proteínas individuales presentes en los sobrenadantes de ultracentrifugación (SU) obtenidos a partir de leche desnatada control (0 min de tiempo de mantenimiento de la presión y de despresurización) y leche presurizada a 350 MPa, a 25°C, durante 5 min, (los valores se representan como porcentaje del contenido individual de cada caseína en la leche cruda desnatada, estimado por EC).

Tiempo de mantenimiento (min)	Tiempo de despresurización (min)	$\alpha$ -La	$\beta$ -Lg	$\alpha_{S2}$ -CN	$\alpha_{S1}$ -CN	$\alpha_{S0}$ -CN	$\kappa$ -CN	$\beta$ -CN B	$\beta$ A <sub>1</sub> -CN	$\beta$ A <sub>2</sub> -CN
0	0	107.93 <sup>aA</sup>	101.34 <sup>aB</sup>	15.05 <sup>bB</sup>	13.30 <sup>dD</sup>	14.96 <sup>bD</sup>	23.19 <sup>cD</sup>	24.88 <sup>bC</sup>	16.98 <sup>cD</sup>	21.39 <sup>cC</sup>
5	0.07	102.61 <sup>aA</sup>	90.57 <sup>abA</sup>	29.18 <sup>aA</sup>	25.34 <sup>cC</sup>	27.19 <sup>aC</sup>	33.89 <sup>bCD</sup>	35.91 <sup>aB</sup>	25.93 <sup>bC</sup>	29.75 <sup>bB</sup>
6	0.07	100.53 <sup>a</sup>	88.61 <sup>bc</sup>	27.66 <sup>a</sup>	26.88 <sup>bc</sup>	29.57 <sup>a</sup>	37.94 <sup>ab</sup>	37.76 <sup>a</sup>	26.82 <sup>b</sup>	29.58 <sup>b</sup>
10	0.07	95.85 <sup>a</sup>	78.33 <sup>c</sup>	29.75 <sup>a</sup>	29.64 <sup>ab</sup>	26.86 <sup>a</sup>	40.51 <sup>a</sup>	*34.66 <sup>a</sup>	*29.66 <sup>a</sup>	*32.56 <sup>ab</sup>
15	0.07	91.26 <sup>a</sup>	79.73 <sup>bc</sup>	32.17 <sup>a</sup>	*30.29 <sup>a</sup>	*30.72 <sup>a</sup>	*40.97 <sup>a</sup>	*37.45 <sup>a</sup>	*31.19 <sup>a</sup>	*36.07 <sup>a</sup>
5	1	97.93 <sup>A</sup>	88.62 <sup>A</sup>	30.73 <sup>A</sup>	28.52 <sup>BC</sup>	29.56 <sup>BC</sup>	38.64 <sup>BC</sup>	37.48 <sup>B</sup>	30.01 <sup>C</sup>	35.07 <sup>B</sup>
5	5	100.77 <sup>A</sup>	88.41 <sup>A</sup>	31.24 <sup>A</sup>	32.51 <sup>B</sup>	33.92 <sup>AB</sup>	49.35 <sup>AB</sup>	*45.97 <sup>A</sup>	*37.70 <sup>B</sup>	*43.06 <sup>A</sup>
5	10	99.89 <sup>A</sup>	88.00 <sup>A</sup>	35.33 <sup>A</sup>	*37.91 <sup>A</sup>	*39.31 <sup>A</sup>	*53.49 <sup>A</sup>	*49.00 <sup>A</sup>	*44.18 <sup>A</sup>	*48.18 <sup>A</sup>
<sup>1</sup> SD total		4.65	3.13	2.17	0.87	2.17	1.76	2.38	0.46	1.42
<sup>2</sup> SD total		3.79	1.82	2.30	1.23	1.31	3.14	2.22	1.20	1.90

<sup>a-c</sup> Diferentes superíndices en letras minúsculas, en columnas, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) producidas por el tiempo de mantenimiento de la presión. <sup>A-D</sup> Diferentes superíndices en letras mayúsculas, en columnas, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) producidas por el tiempo de despresurización. \* Indica diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre valores correspondientes al mismo tiempo total de tratamiento, con diferentes combinaciones de tiempo de mantenimiento y de despresurización a cada nivel de presión. <sup>1</sup> SD total de los valores correspondientes a los SU de leche control y leche presurizada durante 5, 6, 10 y 15 min y despresurizada en 0.07 min. <sup>2</sup> SD total de los valores correspondientes a los SU de leche control y leche presurizada durante 5 min y despresurizada en 0.07, 1, 5 y 10 min.

### III.3.2. Solubilización de caseínas y desnaturalización de proteínas del suero en leche presurizada en presencia de agentes bloqueantes de grupos sulfhidrilo

Como muestra la Tabla 10, el empleo de NEM para dificultar las reacciones de intercambio tiol-disulfuro no influyó en la solubilización de caseínas inducida por la alta presión, que tuvo lugar en mayor grado después de tiempos largos de despresurización en comparación con tiempos equivalentes de mantenimiento de la presión seguidos despresurización rápida (0.07 min).

**Tabla 10.** Contenido en proteínas (expresado como porcentaje de las proteínas totales de la leche  $\pm$  desviación estándar) de los sobrenadantes de ultracentrifugación (SU) y de la fracción soluble a pH 4.6 de la leche desnatada control con NEM y DMF (0 min de tiempo de mantenimiento de la presión y de despresurización) y de la leche presurizada con NEM y DMF, a 350 MPa y 25°C a diferentes tiempos de mantenimiento de la presión y de despresurización.

Tiempo de mantenimiento (min)	Tiempo de despresurización (min)	SU		4.6	
		NEM	DMF	NEM	DMF
0	0	32.41 <sup>bC</sup> $\pm$ 2.47	32.41 <sup>cC</sup> $\pm$ 0.96	21.08 <sup>aA</sup> $\pm$ 4.1	24.85 <sup>aA</sup> $\pm$ 0.67
5	0.07	40.07 <sup>aB</sup> $\pm$ 0.35	38.24 <sup>bB</sup> $\pm$ 0.84	19.31 <sup>aA</sup> $\pm$ 0.94	22.61 <sup>bB</sup> $\pm$ 0.94
10	0.07	*38.74 <sup>a</sup> $\pm$ 3.33	*39.57 <sup>b</sup> $\pm$ 2.60	20.86 <sup>a</sup> $\pm$ 3.50	21.00 <sup>b</sup> $\pm$ 0.71
15	0.07	*39.03 <sup>a</sup> $\pm$ 0.18	*44.76 <sup>a</sup> $\pm$ 0.18	20.64 <sup>a</sup> $\pm$ 0.71	21.00 <sup>b</sup> $\pm$ 0.47
5	5	*50.78 <sup>A</sup> $\pm$ 1.80	*51.62 <sup>A</sup> $\pm$ 0.82	20.64 <sup>A</sup> $\pm$ 0.39	22.30 <sup>B</sup> $\pm$ 0.90
5	10	*52.10 <sup>A</sup> $\pm$ 0.70	*53.95 <sup>A</sup> $\pm$ 1.26	20.58 <sup>A</sup> $\pm$ 1.21	23.00 <sup>AB</sup> $\pm$ 0.63

<sup>a-c</sup> Diferentes superíndices en letras minúsculas, en columnas, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) producidas por el tiempo de mantenimiento de la presión. <sup>A-C</sup> Diferentes superíndices en letras mayúsculas, en columnas, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) producidas por el tiempo de despresurización. \* Indica diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre valores correspondientes al mismo tiempo total de tratamiento, con diferentes combinaciones de tiempo de mantenimiento y de despresurización a cada nivel de presión.

Por otro lado, como se esperaba, la adición de NEM a la leche previno la desnaturalización de las proteínas de suero a 350 MPa. Los experimentos en los que se añadió DMF, en la que se disolvió el NEM, a la leche también sugirieron una mayor incidencia del tiempo de mantenimiento de la presión que del tiempo de despresurización en la desnaturalización de las proteínas del suero, aunque no hubo diferencias significativas entre los efectos de ambos.

### **III.4. Discusión**

De acuerdo con los resultados obtenidos, a 250 MPa y, especialmente, a 350 MPa se produjo la liberación de caseínas no sedimenables a la fase sérica, influyendo de manera más importante el tiempo de despresurización que el de mantenimiento de la presión en este proceso (Tablas 7-9, Figura 33 A y B, Figura 37). Se ha descrito que, a presiones superiores a 100 MPa, tiene lugar la solubilización de las caseínas como resultado de la ruptura micelar (López-Fandiño y col., 1998; Huppertz y col., 2004c; Anema, 2008b). Sin embargo, a presiones de 250 y 300 MPa, si bien se desintegra la micela de caseína durante los primeros 5-10 min de tratamiento durante tratamientos más prolongados se produce agregación de las proteínas debido a un aumento de las interacciones hidrofóbicas a esas presiones intermedias, aunque tratamientos a 250 MPa de 5 a 15 min, como los usados en este estudio, son demasiados cortos para inducir agregación micelar (Huppertz y col., 2006b; Huppertz y De Kruif, 2006, 2007b). Por otra parte, otros autores también han observado agregación de partículas micelares, debido al restablecimiento de los enlaces hidrofóbicos tras la liberación de la presión, siempre y cuando estas micelas mantengan un cierto grado de integridad y parte de la estructura del CCP intacto (Huppertz y col., 2006b; Orlén y col., 2006; Anema, 2008b).

A pesar de que la presión rompe los enlaces electrostáticos e hidrofóbicos éstos podrían empezar a formarse de nuevo durante la despresurización. Sin embargo, nuestros resultados mostraron claramente que durante la fase de despresurización se produce un aumento significativamente mayor del contenido de caseínas no sedimentables que el que tiene lugar durante la fase de mantenimiento de la presión. Según Merel-Rausch y col. (2006; 2007), a presiones superiores a 200 MPa, la velocidad de despresurización juega un papel importante en la modificación de las caseínas, ya que, la despresurización lenta favorecería la reasociación de las caseínas, mientras que la rápida perturbaría a los mecanismos de



asociación, formándose estructuras o agregados completamente nuevos. Teniendo en cuenta las observaciones de Merl-Rausch y col. (2006; 2007), nuestros resultados indican que es posible que tenga lugar una importante disociación micelar, que aumente las caseínas no sedimentables, bajo condiciones que también promuevan la reagregación micelar. De hecho, en muestras de leche sometidas a presiones de 250-300 MPa, en las que se ha producido agregación micelar, se encuentran altos niveles de caseínas no sedimentables (Anema y col., 2005a). Esto sugiere que la agregación micelar es un fenómeno independiente de la disgregación micelar, aún cuando parece necesario un nivel mínimo de ruptura micelar para que se produzca, posteriormente, agregación (Huppertz y De Kruif, 2006; Anema, 2008b).

Los resultados obtenidos apoyaron estudios previos que indican que la  $\beta$ -Lg se desnaturaliza a presiones superiores de 100 MPa en función del nivel de presión y la duración del tratamiento (López-Fandiño y col., 1996; Anema y col., 2005b). El desplegamiento reversible de la  $\beta$ -Lg inducido por la presión (exposición de regiones hidrofóbicas y del grupo sulfhidrilo libre) va seguido de una desnaturalización irreversible, por autoagregación o asociación a otras proteínas de suero, o a la  $\kappa$ -CN (López-Fandiño y col., 1997; Needs y col., 2000b; Patel y col. 2006). Al igual que nosotros, otros autores también han observado que la mayoría de la  $\beta$ -Lg desnaturalizada permanece soluble en leche presurizada a 250 y 350 MPa, al pH normal de la leche (Tablas 2 y 3, Figuras 36 y 33) (López-Fandiño y col., 1998; Anema, 1998), lo que sugiere que las moléculas de  $\beta$ -Lg interaccionan preferentemente entre ellas o con partículas de caseína no sedimentable. Además, nuestros resultados (Tabla 7, Figuras 34 y 36) pusieron de manifiesto que la  $\beta$ -Lg se desnaturalizó principalmente durante la fase de mantenimiento de la presión, bajo condiciones de alta solubilidad del fosfato cálcico e inhibición de las interacciones hidrofóbicas, produciéndose muy poca desnaturalización adicional durante la fase de despresurización. Esto apoya la hipótesis de que las reacciones de intercambio -SH-S-S se dan principalmente durante el tratamiento de presión (Belloque y col., 2000) y sugiere que las uniones hidrofóbicas que se restablecen durante la fase de liberación de la presión no participan de manera importante en la desnaturalización de la  $\beta$ -Lg.

Nuestros resultados también sugirieron que la desnaturalización de las proteínas de suero no ejerce una influencia apreciable en el aumento del contenido de caseína no sedimentable producido durante la fase de despresurización, ya que dicho aumento no se acompañó de cambios importantes en los niveles de proteínas de suero presentes en los SU

(Tablas 2 y 3, Figuras 33 A,B y 37), ni de un aumento en la desnaturalización de las proteínas de suero, determinado por la pérdida de solubilidad a pH 4.6 (Tabla 7, Figuras 33 C, D y 36). Como era de esperar, la adición de NEM previno la formación de enlaces disulfuro, evitando la en gran medida la desnaturalización de las proteínas de suero y su asociación con las caseínas (Huppertz y col., 2004b), pero no ejerció ningún efecto en la liberación de caseínas a la fase soluble de la leche que tuvo lugar durante la fase de despresurización (Tabla 10). De modo similar, es probable que los cambios en el tamaño micelar inducidos por la presión sean independientes de las proteínas de suero, ya que se encuentran tamaños micelares similares en leche presurizada tanto con la adición de NEM como sin él (Huppertz y col., 2004d). Igualmente la disgregación micelar y la reagregación que tienen lugar a 250 y 300 MPa son similares en presencia y en ausencia de proteínas de suero (Anema y col., 2005a; Huppertz y De Kruif, 2007b).

### **III.5. Conclusiones**

Este trabajo muestra el efecto de la velocidad de despresurización en la distribución de proteínas entre las fases soluble y coloidal de la leche presurizada. El contenido en caseína soluble aumentó significativamente durante la fase de despresurización respecto a la fase de mantenimiento de la presión, mientras que la desnaturalización de la  $\beta$ -Lg tuvo lugar, mediante enlaces disulfuro, fundamentalmente durante la fase de mantenimiento. Estos resultados corroboran los recogidos en el capítulo anterior, demostrando que la desnaturalización de las proteínas de suero no influye en la ruptura micelar y en la subsiguiente solubilización de caseínas que tiene lugar en la leche presurizada y evidencian la importancia de la fase de despresurización en este proceso, de modo que cuanto más lenta sea la velocidad de despresurización, mayor es el nivel de caseína soluble.

## **CAPITULO IV**

**Estudio de la distribución proteica en muestras tratadas  
con altas presiones entre 700 y 900 MPa**



## IV.1. Introducción

En las últimas tres décadas, el conocimiento sobre el efecto de las altas presiones en los alimentos se ha ampliado enormemente sobre todo, en la leche y sus proteínas, encontrándonos varios trabajos en la bibliografía que resumen estos efectos (Huppertz y col., 2002; López-Fandiño, 2006a; Huppertz y col., 2006a; Considine y col., 2007). Este gran conocimiento ha permitido el desarrollo de esta técnica como medio para la conservación de los alimentos, aumentado la implantación de equipos de alta presión, capaces de alcanzar los 650 MPa, en las industrias alimentarias. En concreto, en el 2009 los equipos industriales instalados fueron 132 en todo el mundo, existiendo una gran variedad de productos comerciales presurizados como calostros, zumos, guacamole, fiambre, arroz, etc (Barbosa-Cánovas y Bermúdez-Aguirre, 2011; Tonello, 2011). Sin embargo, la tecnología continua avanzando y actualmente podemos encontrar equipos a escala piloto que pueden llegar hasta los 900 MPa e incluso hasta 1800 MPa en equipos de laboratorio (Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas, 2011). Lo que hace necesario continuar investigando en los efectos de las muy altas presiones ( $> 650$  MPa) en los alimentos.

En la leche, las altas presiones reducen sus propiedades de dispersión de la luz, disminuyen su turbidez y cambian su apariencia visual, debido a la desintegración de la micela de caseína en estructuras más pequeñas (Needs y col., 2000b; Considine y col., 2007). Tanto las micelas de caseínas de la leche presurizada como las de leche sin presurizar se mantienen primariamente por la interacciones hidrofóbicas e uniones con el CCP (Huppertz y col., 2006a) aunque también juega un papel muy importante en su estabilidad la  $\kappa$ -CN (Fox y Brodkorb, 2008). La desintegración de la micela inducida por la presión, se produce por la solubilización del CCP que forma parte de las micelas (López-Fandiño y col., 1998; Huppertz y De Kruif, 2007a) y por la ruptura de las interacciones hidrofóbicas, de hidrogeno y de van der Waals (López-Fandiño, 2006a).

Como consecuencia de la desintegración de la micela inducida por la presión, el tamaño medio de la micela cambia y el grado de su modificación variará dependiendo de varios factores como la duración del tratamiento, la temperatura, la presencia de proteínas de suero, el pH de la leche, la aplicación de varios ciclos de presión, etc (Huppertz y col., 2006a). Por ejemplo, el tamaño de la micela en leche tratada a 250-300 MPa puede ser mayor o menor que los de la leche sin tratar dependiendo de la duración y la temperatura del tratamiento

(Huppertz y col., 2004a; Regnault y col., 2004; Anema y col., 2005a). Sin embargo, los tratamientos a presiones  $\geq 400$  MPa reducen considerablemente el tamaño micelar (Needs y col., 2000b; Huppertz y col., 2004a; Anema y col., 2005a). Gebhardt y col. (2006) observaron por microscopía de fuerza atómica *ex-situ* que las micelas nativas (170 nm) empiezan a descomponerse a presiones bajas ( $>40$  MPa) formando pequeñas partículas de entre 10 y 20 nm. Sin embargo, para una completa descomposición en monómeros es necesario presiones superiores a 280 MPa.

Otro de los efectos de las altas presiones en la leche es que produce desnaturalización de las proteínas del suero ya que produce el desplegamiento de estas proteínas. Sin embargo, la estabilidad de las proteínas séricas a la presión varia dependiendo de su estructura, de hecho la  $\beta$ -Lg es la más sensible y la  $\alpha$ -La la más resistente a la presión (López-Fandiño, 2006a). Las altas presiones producen el desplegamiento de la estructura de la  $\beta$ -Lg exponiendo el grupo sulfidrilo libre, que puede reaccionar con otras proteínas formando como la  $\kappa$ -CN,  $\alpha_{s2}$ -CN,  $\alpha$ -La o  $\beta$ -Lg (Huppertz y col., 2004b; Patel y col., 2006). La  $\beta$ -Lg empieza a desnaturalizarse a partir de los 200 MPa, Anema (2008a) observó un  $\sim 30\%$  de desnaturalización en tratamientos de 30 min que fue incrementando con el aumento de la presión, llegando a una desnaturalización del 90% a 800 MPa. En cambio la desnaturalización de la  $\alpha$ -La no se produce hasta los 400-500 MPa (Anema y col., 2005b; Hinrichs y Rademacher, 2005; Anema, 2008a) observándose desnaturalizaciones de en torno al 30-40% a 800 MPa (Huppertz y col. 2004b; Anema, 2008a)

A pesar de que ya existen algunos estudios sobre el efecto de presiones hasta 800 MPa en el tamaño micelar y la desnaturalización de las proteínas mayoritarias del suero aún se necesita profundizar en el efecto de estas presiones en la disgregación micelar.

Así, el objetivo propuesto para este estudio fue investigar el efecto de la aplicación de muy altas presiones (700, 800 y 900 MPa) a la leche, en la distribución proteica de diferentes fracciones lácteas, profundizando en el estudio del tamaño de la micela de caseína y la desnaturalización de las proteínas minoritarias del suero, entre otros aspectos.

## **IV.2. Materiales y métodos**

La Figura 38 resume el procedimiento experimental seguido en este trabajo.

#### **IV.2.1. Preparación de las muestras**

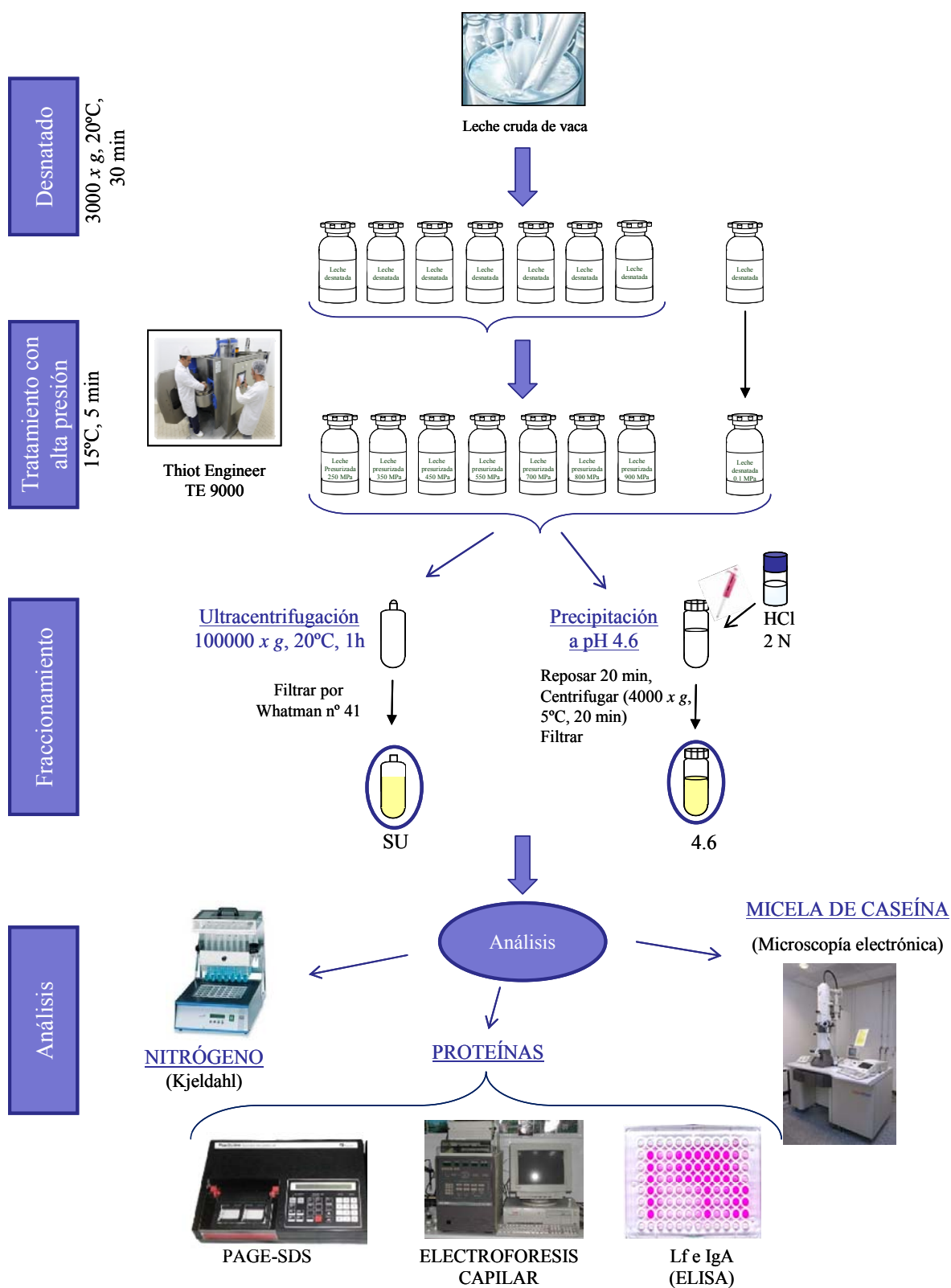
Para realizar este estudio se utilizó leche cruda de vaca procedente de una granja local. La leche se atemperó a 37°C y se procedió a su desnatado.

#### **IV.2.2. Tratamientos de presurización**

Tras el desnatado de la leche, se llevaron a cabo los tratamientos con alta presión a 250, 350, 450, 550, 700, 800 y 900 MPa, a 15°C durante 5 min. Para ello, la leche, atemperada a 15°C, se dispensó en bolsas selladas térmicamente que se introdujeron en un equipo de alta presión TE 9000 (Thiot Ingenierie, NC Hyperbaric, Bretenoux, France-Burgos, España). Este equipo es capaz de alcanzar 900 MPa a una velocidad de 6 MPa/seg, tiene una cámara de presurización de 2 L de capacidad, y utiliza aceite de silicona como fluido transmisor, como se ha explicado en detalle en el capítulo II, apartado II.2.2. Los tratamientos se hicieron por duplicado.

#### **IV.2.3. Fraccionamiento y análisis**

Posteriormente, las muestras de leche presurizada se fraccionaron y se analizaron como se indica en el apartado de Materiales y Métodos generales.(pag. 43-50).



**Figura 38.** Esquema de la preparación, tratamientos con alta presión, fraccionamiento y análisis de las muestras



### IV.3. Resultados

#### IV.3.1. Efecto de la presión en el tamaño de la micela de caseína

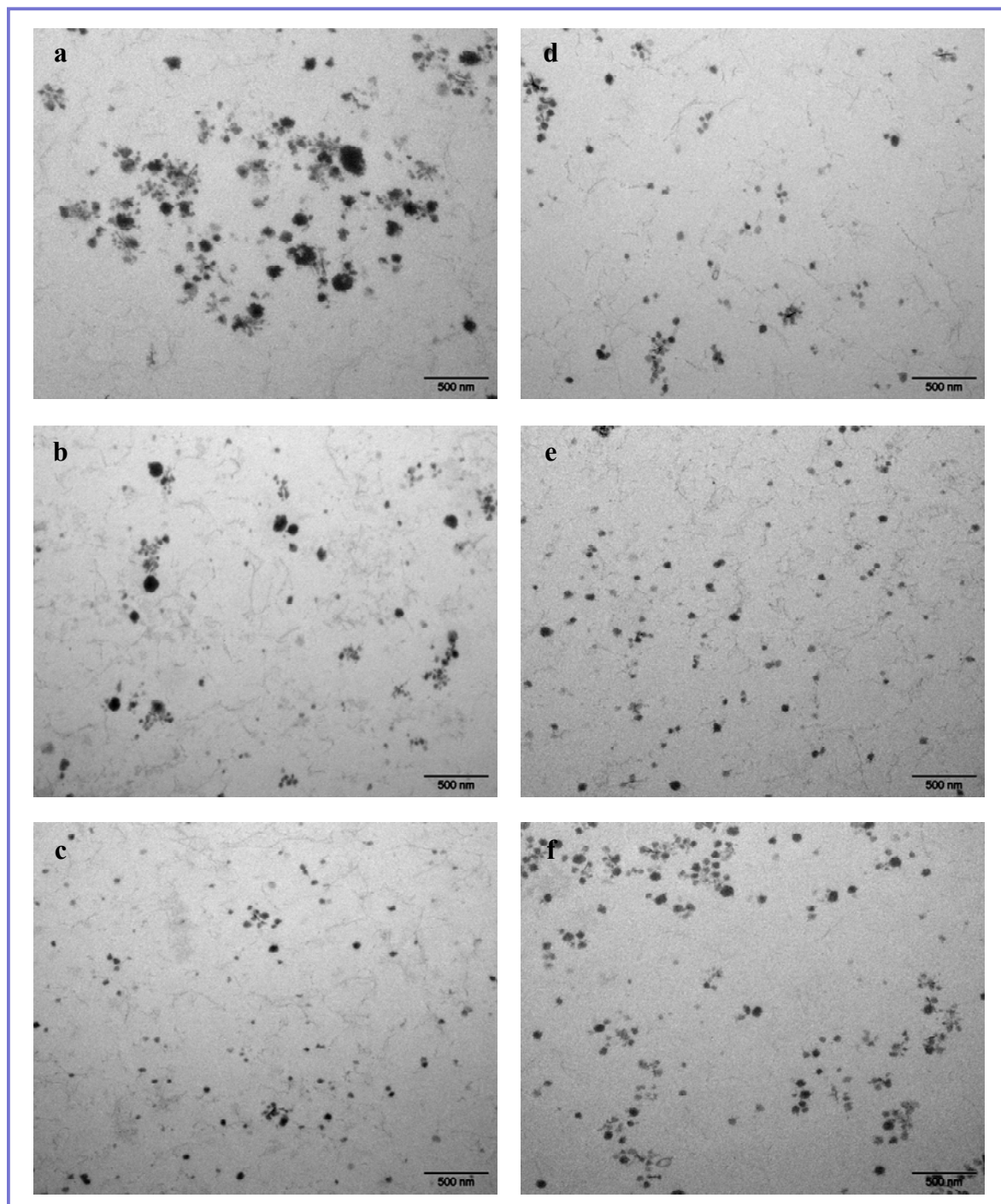
Las fotografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión de la leche sometida a altas presiones se presentan en la Figura 39. La medida del tamaño de las micelas mostró que en la leche control presentaban una gran dispersión en el tamaño, desde 255 nm a 17 nm, que fue acortándose por efecto de la presión (Tabla 11, Figura 39). La aplicación de presión provocó la ruptura de las micelas de caseína y disminuyó el número de micelas de gran tamaño (Figura 39, Figura 40). A 250 MPa, todavía eran visibles algunas micelas grandes (231 nm) que desaparecieron a presiones superiores. A partir de 450 MPa, las micelas mayores medían entre 100 y 115 nm, y estaban presentes en bajo número y a todas las presiones (Tabla 11, Figura 40). Este hecho provocó el aumento del número de micelas de tamaño comprendido entre 20 y 60 nm que predominantes a presiones  $\leq 450$  MPa (Figura 40).

**Tabla 11.** Tamaño de las micelas de caseína (nm) observadas por microscopía electrónica de transmisión de leche desnatada control (0.1 MPa) y leche sometida a diferentes presiones durante 5 min.

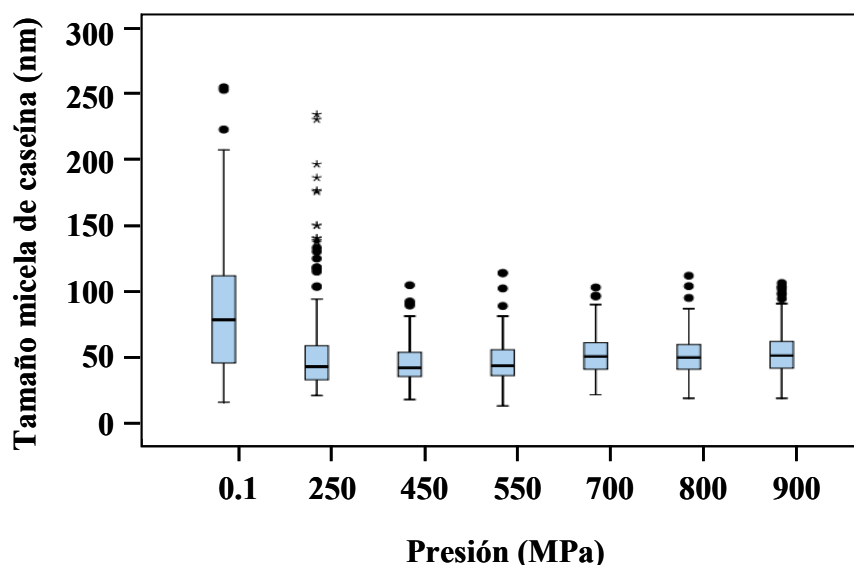
**Tamaño de las micelas de caseína (nm)**

	Media	SD	Mínimo	Máximo	Nº micelas medidas
<b>0.1</b>	83.82	44.45	16.86	254.89	157
<b>250</b>	56.49	38.39	21.94	234.38	187
<b>450</b>	45.97	15.32	18.84	105.30	179
<b>550</b>	48.10	17.40	14.05	114.63	149
<b>700</b>	52.69	15.34	22.47	103.60	182
<b>800</b>	51.86	15.77	19.86	112.44	164
<b>900</b>	53.65	16.89	19.86	106.90	170

SD indica desviación estándar.



**Figura 39.** Fotografías de microscopía electrónica de transmisión de leche desnatada control (a) y leche presurizada a 250, 450, 700, 800 y 900 MPa, 15°C durante 5 min.



**Figura 40.** Representación en diagrama de caja de los tamaños de las micelas de caseína observados en leche sin presurizar (0.1 MPa) y presurizada a 250, 450, 550, 700, 800 y 900 MPa, 15°C durante 5 min a partir de fotografías de microscopía electrónica.

#### IV.3.2. Efecto de la presión en la distribución proteica

El contenido de proteínas no sedimentables y de proteínas solubles a pH 4.6 de la leche tratada con altas presiones de 250 a 900 MPa se muestran en la Tabla 12. A 250 MPa se produjo un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) del contenido proteico de los sobrenadantes de ultracentrifugación (SU) debido al tratamiento de presión respecto al de la leche sin presurizar. Sin embargo, a partir de 450 MPa y hasta los 900 MPa, disminuyó dicho contenido aunque no se observaron diferencias significativas.

Por otro lado, el efecto de la presión se observó de manera notable en las fracciones solubles a pH 4.6 (Tabla 12). Los contenidos proteicos de estas fracciones disminuyeron significativamente ( $P > 0.05$ ) con el aumento del nivel de presión a partir de 250 MPa hasta 800 MPa, donde esta disminución gradual se estabilizó.

**Tabla 12.** Contenido proteico (g/L  $\pm$  desviación estándar) de los sobrenadantes de ultracentrifugación (SU) y de las fracciones solubles a pH 4.6 (4.6) de la leche desnatada control (0.1 MPa) y leche presurizada de 250 a 900 MPa, a 15°C durante 5 min.

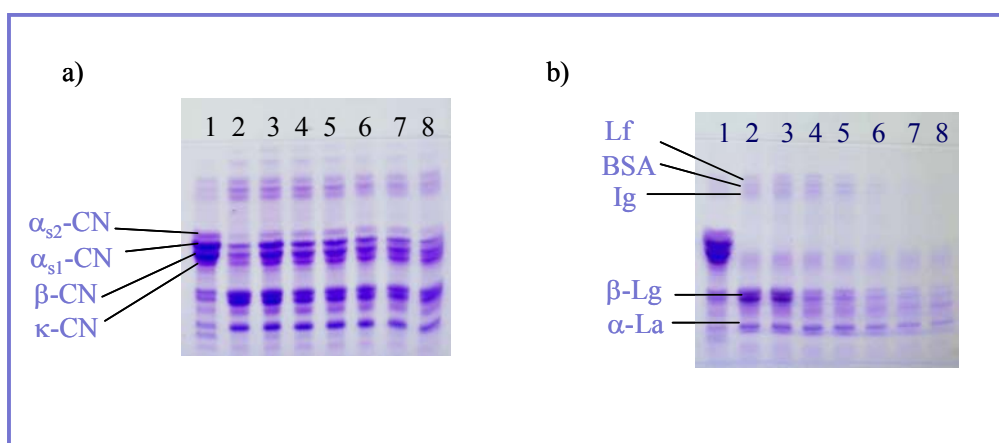
<b>Presión (MPa)</b>	<b>SU</b>	<b>4.6</b>
<b>0.1</b>	10.51 <sup>b</sup> $\pm$ 0.07	8.52 <sup>a</sup> $\pm$ 0.01
<b>250</b>	12.92 <sup>a</sup> $\pm$ 0.04	8.54 <sup>a</sup> $\pm$ 0.00
<b>450</b>	11.50 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.09	6.40 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
<b>550</b>	11.37 <sup>b</sup> $\pm$ 0.04	5.82 <sup>c</sup> $\pm$ 0.01
<b>700</b>	10.68 <sup>b</sup> $\pm$ 0.07	4.87 <sup>d</sup> $\pm$ 0.00
<b>800</b>	10.54 <sup>b</sup> $\pm$ 0.07	4.34 <sup>e</sup> $\pm$ 0.02
<b>900</b>	10.20 <sup>b</sup> $\pm$ 0.07	4.24 <sup>e</sup> $\pm$ 0.01

<sup>a-e</sup> Las letras en minúsculas, en columnas, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) producidas por el nivel de presión.

El análisis de las fracciones por PAGE-SDS permitió determinar la composición proteica de las mismas. En los sobrenadantes de ultracentrifugación se observan las bandas correspondientes a las principales proteínas de la leche (Figura 41a). La intensidad de las bandas de las caseínas mayoritarias ( $\alpha_{S2-}$ ,  $\alpha_{S1-}$ ,  $\beta$ - y  $\kappa$ -CN) aumentó debido a los tratamientos de presión hasta los 550 MPa (calle 5), indicando un mayor contenido en caseínas no sedimentables. Sin embargo, el aumento del nivel de presión entre 700 y 900 MPa no produjo una mayor solubilización de las caseínas. En relación a las proteínas de suero presentes en estas fracciones, el aumento de la presión hasta 900 MPa produjo la precipitación de la  $\beta$ -Lg y de las proteínas minoritarias, Lf, Ig y BSA, efecto que fue más perceptible a mayores presiones y que fue responsable de la disminución observada del contenido en nitrógeno de las SU (Tabla 12).

En la fracción soluble a pH 4.6, la concentración de proteínas de suero solubles disminuyó de modo más drástico que en los sobrenadantes de ultracentrifugación (Figura 41b). En este caso, las bandas correspondientes a todas las principales proteínas del suero

disminuyeron de intensidad a medida que se incrementó el nivel de presión y, en el caso de las proteínas Lf, Ig y BSA, las bandas dejaron de ser perceptibles a presiones > 700 MPa. Esta severa disminución en el contenido de proteínas solubles justifica la reducción observada anteriormente en el contenido proteico total de las fracciones solubles a pH 4.6, que llega al 50% tras tratamientos a 900 MPa. (Tabla 12).



**Figura 41.** PAGE-SDS de los sobrenadantes de ultracentrifugación (a) y de las fracciones solubles a pH 4.6 (b) de leche desnatada control y presurizada a 250-900 MPa y 15°C durante 5 min. Calles: 1. Leche desnatada; 2-8: tratamientos con presión a 250, 450, 550, 700, 800 y 900 MPa.

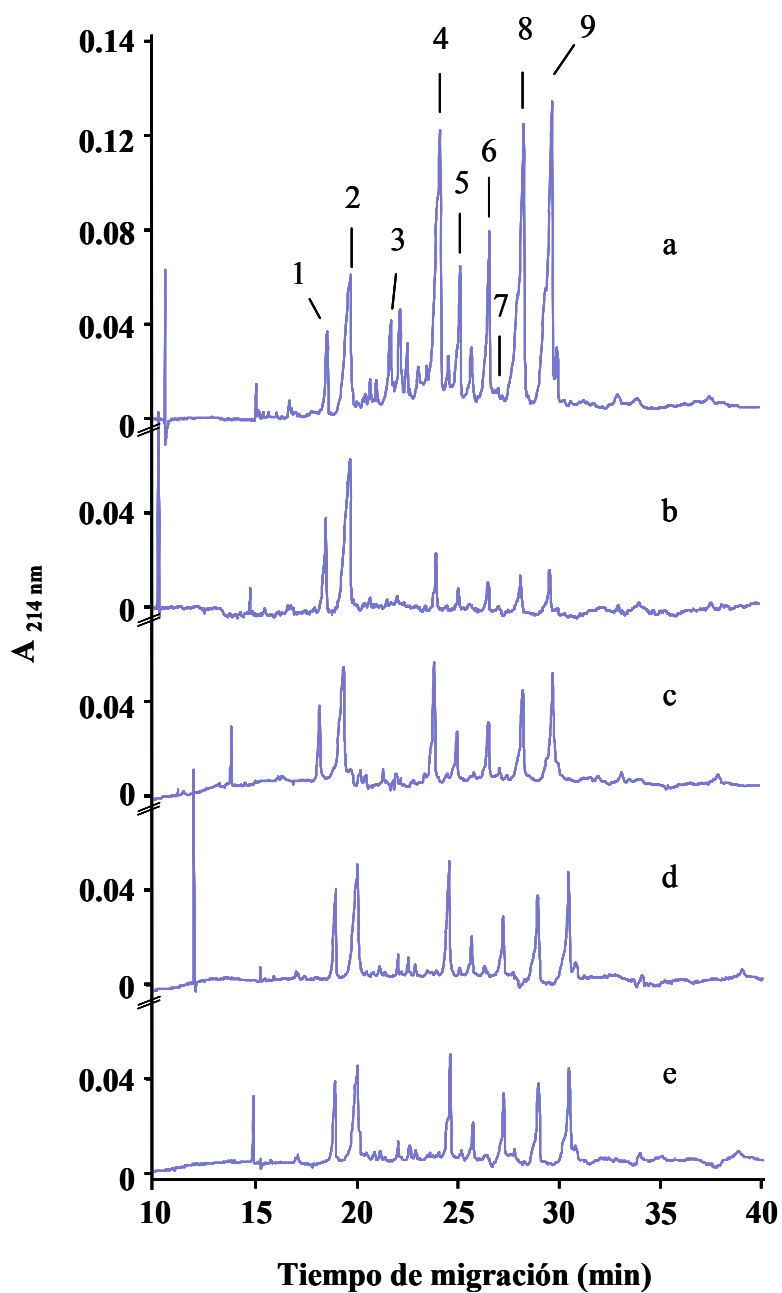
En la Figura 42 se muestran los electroforegramas de los sobrenadantes de ultracentrifugación de leche sometida a las mayores presiones ensayadas, comprendidas entre 700 y 900 MPa. Los electroforegramas mostraron que se produjo un incremento en el contenido de todas las caseínas solubles en los sobrenadantes de ultracentrifugación respecto al contenido de los sobrenadantes de leche control, al igual que habíamos observado anteriormente (análisis por SDS-PAGE), que fue máximo a presiones comprendidas entre 250 y 550 MPa. Sin embargo, la utilización de presiones de 700, 800 y 900 MPa no solubilizó más caseínas, permaneciendo constante su contenido (Tabla 13).

En esta fracción también se observaron proteínas de suero. Las utilización de presiones  $\geq 700$  MPa redujo la solubilidad de la  $\beta$ -Lg al pH normal de la leche en un 37%, aproximadamente, a 900 MPa. En cambio, en la  $\alpha$ -La, dichas presiones no produjeron significativas pérdidas de solubilidad (Figura 42, Tabla 13).

**Tabla 13.** Proteínas individuales presentes en los sobrenadantes de ultracentrifugación (SU) obtenidos a partir de leche desnatada control (0.1 MPa) y leche presurizada a 700, 800 y 900 MPa, a 15°C, durante 5 min (los valores se representan como porcentaje del contenido individual de cada caseína en la leche cruda desnatada, estimado por EC).

Presión (MPa)	$\alpha$ -La	$\beta$ -Lg	$\alpha$ s <sub>2</sub> -	$\alpha$ s <sub>1</sub> -	$\alpha$ s <sub>1</sub> - 9P	K-CN	$\beta$ A <sub>1</sub> -	$\beta$ A <sub>2</sub> -
<b>0.1</b>	99.48 <sup>a</sup>	101.94 <sup>a</sup>	n.d.	7.37 <sup>b</sup>	7.54 <sup>b</sup>	9.11 <sup>b</sup>	9.24 <sup>b</sup>	8.43 <sup>b</sup>
<b>700</b>	97.23 <sup>a</sup>	80.03 <sup>b</sup>	18.23 <sup>a</sup>	20.50 <sup>a</sup>	27.50 <sup>a</sup>	31.97 <sup>a</sup>	20.83 <sup>a</sup>	22.79 <sup>a</sup>
<b>800</b>	89.36 <sup>a</sup>	59.44 <sup>c</sup>	21.67 <sup>a</sup>	22.55 <sup>a</sup>	23.51 <sup>a</sup>	30.83 <sup>a</sup>	19.03 <sup>a</sup>	21.47 <sup>a</sup>
<b>900</b>	90.65 <sup>a</sup>	62.95 <sup>c</sup>	22.21 <sup>a</sup>	20.53 <sup>a</sup>	22.78 <sup>a</sup>	30.91 <sup>a</sup>	18.59 <sup>a</sup>	21.99 <sup>a</sup>
<b>SD</b>	12.51	2.90	1.35	2.58	2.25	2.58	2.17	1.67

<sup>a-d</sup> Diferentes superíndices, en columnas, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) producidas por el tratamiento de presión. SD indica la desviación estándar.



**Figura 42.** Electroforegramas de leche desnatada control (a) y sobrenadantes de ultracentrifugación de: leche desnatada control (b) y leche presurizada a 700, 800 y 900 MPa y 25°C (c-e). 1:  $\alpha$ -La; 2:  $\beta$ -Lg; 3:  $\alpha_{S2}$ -CN; 4:  $\alpha_{S1}$ -CN; 5:  $\alpha_{S1}$ -CN 9P; 6:  $\kappa$ -CN; 7:  $\beta$ B-CN; 8:  $\beta$ A<sub>1</sub>-CN; 9:  $\beta$ A<sub>2</sub>-CN.

La Tabla 14 muestra que, a medida que aumenta la presión, aumenta la relación caseínas/proteínas de suero en los SU procedentes de la leche presurizada respecto al SU de la leche control, al aumentar progresivamente el contenido en caseína soluble. Debido a la desnaturalización de la  $\beta$ -Lg, también aumenta, sobre todo a partir de 550 MPa, la proporción de  $\alpha$ -La respecto a la suma  $\alpha$ -La+  $\beta$ -Lg.

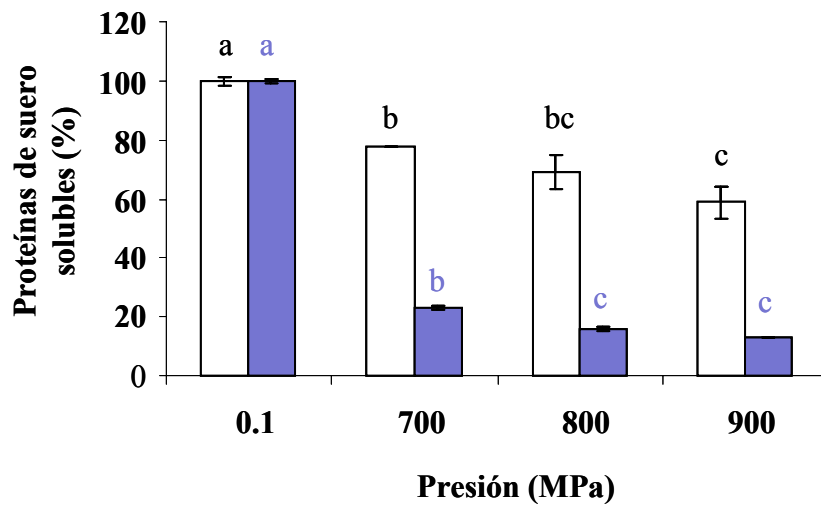
**Tabla 14.** Suma de las áreas de los picos correspondientes a la fracción de proteínas de suero y a la fracción de caseínas obtenidos por electroforesis capilar (en unidades arbitrarias) de la leche cruda de vaca y de los sobrenadantes de ultracentrifugación (SU) obtenidos a partir de leche desnatada control (0.1 MPa) y leche presurizada a 250, 450, 550, 700, 800 y 900 MPa, a 15°C, durante 5 min. Entre paréntesis se muestra el porcentaje que supone cada fracción. También se indica el porcentaje de  $\alpha$ -La respecto de la suma de  $\alpha$ -La y  $\beta$ -Lg.

Presión (MPa)	Área de las proteínas de suero (%)	Área de las caseínas (%)	Relación caseínas/pro- teínas de suero	% $\alpha$ -La respecto de la suma $\alpha$ -La + $\beta$ - Lg.
<b>leche</b>	26.35 (12.65)	182.04 (87,35)	6.9	21.82
<b>0.1</b>	26.72 (64.84)	14.49 (35.17)	0.54	21.41
<b>250</b>	28.44 (43.60)	36.78 (56.40)	1.29	21.52
<b>450</b>	27.06 (42.10)	37.20 (57.90)	1.37	21.95
<b>550</b>	24.27 (28.69)	38.45 (61.30)	1.58	25.79
<b>700</b>	22.08 (34.89)	41.20 (65.11)	1.86	25.32
<b>800</b>	18.10 (31.47)	39.41 (68.53)	2.17	28.34
<b>900</b>	15.18 (27.67)	39.68 (72.33)	2.61	34.32

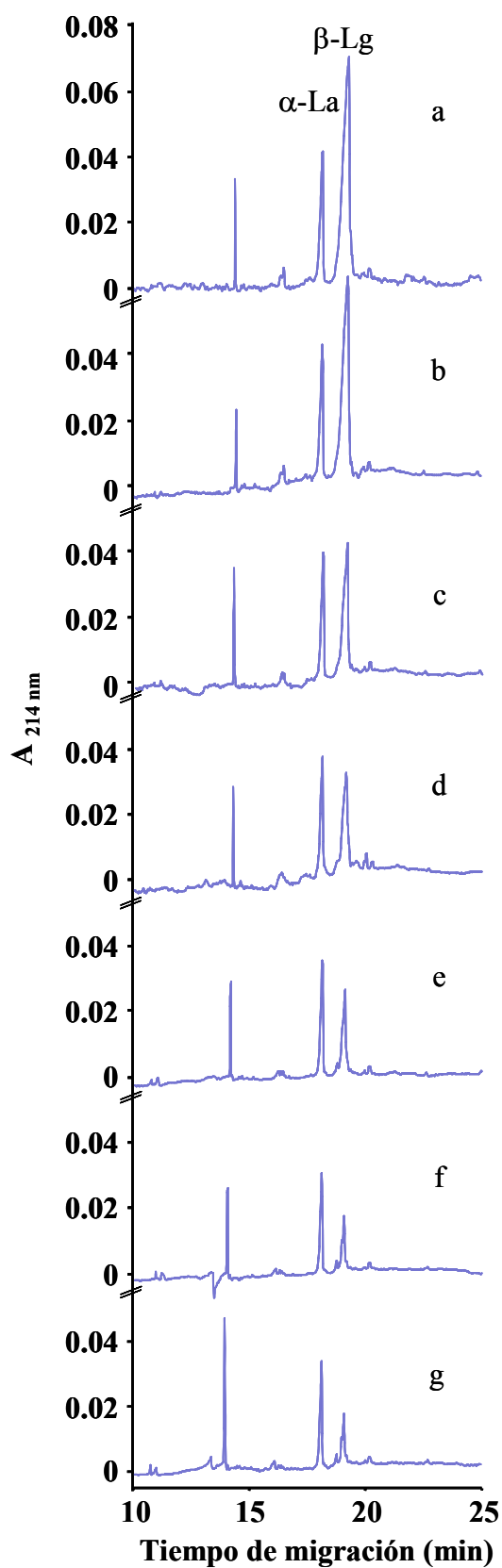
Los electroforegramas (EC) de la fracción soluble a pH 4.6 corroboraron claramente la desnaturalización de las proteínas de suero tratadas con altas presiones. Como era de esperar, la  $\beta$ -Lg fue más sensible a la presión que la  $\alpha$ -La (Figura 43). La  $\beta$ -Lg comienza a desnaturalizarse a 250 MPa (12%), y la desnaturalización aumenta progresivamente con el aumento de la presión hasta los 800 MPa. A presiones  $\geq$  800 MPa solamente un 13-16% de esta proteína permanece soluble a pH 4.6 (Figura 43, Figura 44). Sin embargo, la  $\alpha$ -La



permanece prácticamente invariable hasta los 550 MPa, alcanzando una desnaturalización del 42% a 900 MPa (Figura 43).

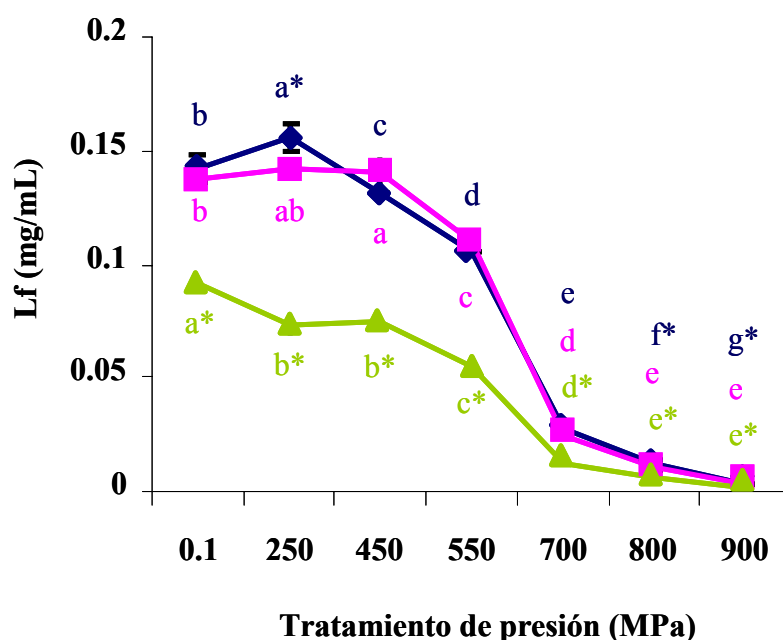


**Figura 43.** Contenido en  $\alpha$ -La (□) y  $\beta$ -Lg (■) de la fracción soluble a pH 4.6, medido por EC, de leche control (0.1 MPa) y presurizada a 700, 800 y 900 MPa. Las barras representan la desviación estándar. Las letras en minúsculas con el mismo color indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) producidas por el nivel de presión.



**Figura 44.** Electroforegramas de la fracción soluble a pH 4.6 de leche desnatada control (a) y de leche presurizada a 250, 450, 550, 700, 800 y 900 MPa, 15°C durante 5 min (b-g).

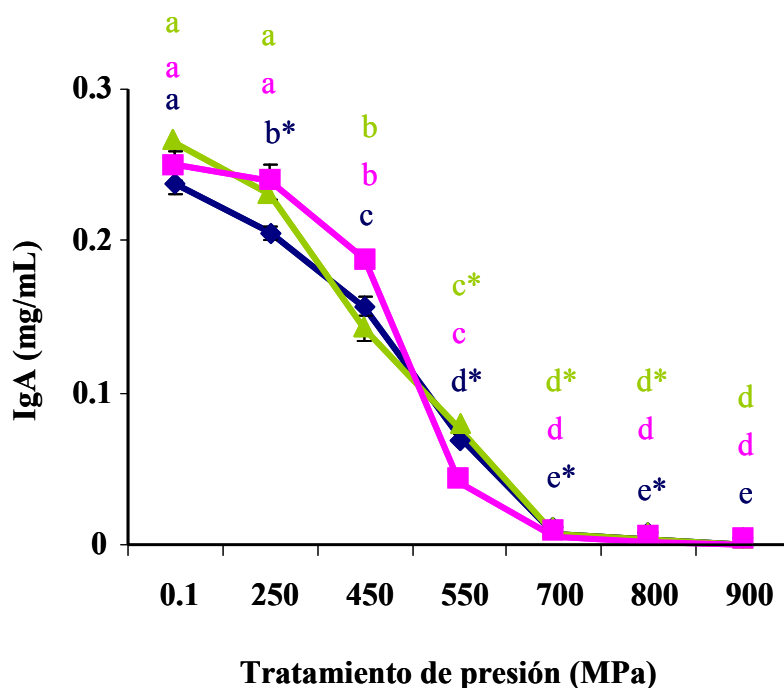
En este estudio también se evaluó el efecto de las altas presiones (250-900 MPa) sobre las proteínas minoritarias del suero de interés nutricional, en concreto Lf e IgA. Los contenidos en Lf de la leche presurizada hasta 900 MPa y de sus fracciones se muestran en la Figura 45. La leche desnatada control presentó un contenido de 0.14 mg/mL que fue disminuyendo por efecto de la presión hasta los 900 MPa, hasta alcanzar 0.0035 mg/mL. En general, las fracciones solubles a pH 4.6 presentaron el mismo contenido en Lf que la leche de la que procedían, mientras que, en los sobrenadantes de ultracentrifugación, el nivel de Lf observado fue significativamente inferior a todas las presiones estudiadas. En cualquier caso, todas las fracciones presentaron el mismo comportamiento frente a la presión: a partir de 550 hasta 800 MPa, el contenido de Lf se redujo significativamente ( $P < 0.05$ ). A 900 MPa también disminuyó, pero las diferencias no fueron significativas.



**Figura 45.** Contenido en lactoferrina de: leche desnatada control (0.1 MPa) y presurizada de 250 a 900 MPa (◆), los sobrenadantes de ultracentrifugación (▲) y las fracciones solubles a pH 4.6 (◻). Las barras representan la desviación estándar. Las letras en minúscula indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) producidas por el nivel de presión en cada fracción (indicada con el mismo color). \* indica diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) de los sobrenadantes de ultracentrifugación respecto a las otras 2 muestras a la presión indicada y \* indica diferencias significativas entre la leche y la fracción soluble a pH 4.6 a la presión indicada.

El contenido de IgA en la leche control (0.24 mg/mL) fue similar en las tres muestras estudiadas (Figura 46). Al aplicar alta presión, este contenido disminuyó progresivamente

hasta los 700 MPa, tanto en la leche como en los sobrenadantes de ultracentrifugación y las fracciones solubles a pH 4.6, llegando a detectarse solamente 0.0079 mg/mL a 700 MPa. A presiones superiores también se observaron reducciones de su contenido, pero las diferencias no fueron significativas (se detectaron 0.0035 y 0.00011 mg/mL de IgA en leche presurizada a 800 y 900 MPa, respectivamente).



**Figura 46.** Contenido en inmunoglobulina A de leche desnatada control (0.1 MPa) y presurizada de 250 a 900 MPa (◆), de los sobrenadantes de ultracentrifugación (▲) y de las fracciones solubles a pH 4.6 (■). Las barras representan la desviación estándar. Las letras en el mismo color indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) producidas por el nivel de presión en cada fracción. \* indica diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) de los sobrenadantes de ultracentrifugación respecto a las otras dos muestras a la presión indicada y \* indica diferencias significativas entre la leche y la fracción soluble a pH 4.6 a la presión indicada.

#### IV.4. Discusión

Los resultados obtenidos indican que el tratamiento de leche a presiones muy elevadas, en torno a 700-900 MPa, no disminuyó el tamaño micelar ni indujo mayor solubilización de caseínas respecto a tratamientos a presiones inferiores de 450-550 MPa. Sin embargo, estos tratamientos produjeron una severa desnaturalización de las proteínas del suero, sobre todo de la  $\beta$ -Lg y de las proteínas minoritarias, Lf e IgA.

Hasta el momento no existían estudios sobre el efecto de presiones muy elevadas (700-900 MPa) en las propiedades de las micelas de caseína o en la distribución proteica de la leche. En general, y como ya se ha mencionado anteriormente, el tamaño micelar medio de la leche tratada a 100-200 MPa a temperatura ambiente se considera comparable al de la leche sin tratar; las micelas en la leche presurizada a 250 MPa durante periodos superiores a 15 min presentan mayor tamaño; mientras que en la leche presurizada a más de 300 MPa se han observado reducciones de tamaño de hasta el 50% (Huppertz y col., 2004a; Anema y col., 2005a) y se mantienen así durante el posterior almacenamiento de la leche presurizada (Huppertz y col., 2004a).

La observación de la micela de caseína por microscopía electrónica de transmisión nos permitió evaluar el efecto de la presión en el tamaño micelar (Figura 39). Los tratamientos con alta presión redujeron el diámetro medio de la micela de caseína hasta los 450 MPa, presión a la cual se alcanzó un plateau. García-Risco y col. (2000) observaron, con esta misma técnica, que a 300 y 400 MPa, (20°C, 15 min) disminuía el diámetro de la micela de caseína de 150-300 nm, en la leche sin presurizar, a 40 nm en la presurizada y que la distribución de tamaño se hacía más homogénea. Por lo general, se considera que, en torno a los 300 MPa en tratamientos de 15 min a temperatura ambiente, se produce la máxima disgregación (Scollard y col., 2000; García-Risco y col., 2003; Anema, 2008a) no observando modificaciones adicionales en el tamaño hasta los 800 MPa. En nuestro estudio el menor tamaño se encontró a 450 MPa, aunque no se pudo comprobar si, efectivamente, era similar a 300 MPa como afirman otros autores (Figura 40, Tabla 11). De acuerdo con García-Risco y col (2003), a 250 MPa se observaron micelas de gran tamaño, similares a las presentes en la leche sin presurizar (en torno a 200 nm), sin embargo, a presiones  $\geq 450$  MPa todas las micelas fueron inferiores a 115 nm, corroborando las observaciones hechas por Needs y col. (2000b) a 400 y 600 MPa, y un 50 % de las micelas estuvieron comprendidas entre 20 y 60 nm.

La disgregación de las micelas de caseína se debe a la solubilización del CCP y a la ruptura de las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas intramicelares (Schrader y col., 1997). De hecho, medidas in situ, han demostrado que la solubilización del CCP es proporcional a la presión aplicada y es completa a 400 MPa, presión a la que la disrupción

micelar también es completa e irreversible (Huppertz y De Kruif, 2007a). Tal disgregación es responsable de que, además de disminuir el tamaño micelar, aumente el número de micelas de caseína y el contenido en proteína no sedimentable por ultracentrifugación, como ya se explicó en los capítulos II y III. En este estudio, los cambios observados en el tamaño micelar fueron concordantes con los niveles de caseína soluble en los sobrenadantes de ultracentrifugación a presiones de 700-900, puesto que no se detectó un incremento significativo en el contenido de caseínas no sedimentables respecto a los observados a menores presiones (250-550 MPa) (Tablas 12, 13 y Figura 42). Así, Anema y col. (2005a) indicaron que el nivel de caseínas no sedimentables está inversamente correlacionado con el tamaño de la micela de caseína, excepto para las muestras agregadas a 250 y 300 MPa.

Los tratamientos a presiones muy elevadas produjeron cambios en las proteínas de suero solubles a pH 4.6 (Figura 41, 43, 44). Se observó una severa desnaturalización de la  $\beta$ -Lg a presiones  $\geq 700$  MPa, en torno al 77%. Garcia-Risco y col. (2000) ya habían observado este grado de desnaturalización a presiones inferiores (400 MPa, 30 min) probablemente debido a la mayor duración del tratamiento. Esta proteína comienza a desnaturalizarse a 100 MPa, aunque la desnaturalización depende del nivel de presión, de la temperatura (López-Fandiño y col., 1996; Huppertz y col., 2002; Anema y col., 2005b) y, como se muestra en el capítulo anterior, de la duración del tratamiento. A partir de 200 MPa durante 30 min, Anema (2008a) observó, aproximadamente, un 30% de desnaturalización de la  $\beta$ -Lg, que se fue incrementando con el aumento de la presión, llegando al 90% a 800 MPa.

La  $\alpha$ -La se desnaturaliza por alta presión notablemente menos que la  $\beta$ -Lg (Huppertz y col., 2004b); Patel y col., 2006), debido al mayor número de puentes disulfuro que presenta la molécula (4 frente a 2 de la  $\beta$ -Lg) y a la ausencia de grupos sulfidrilo libres que pudieran interaccionar con otras proteínas (Hinrichs y col., 1996). Esta proteína permanece estable hasta los 400-500 MPa (Anema y col., 2005b; Hinrichs y Rademacher, 2005), sin embargo, a mayores presiones se hace patente la desnaturalización de la  $\alpha$ -La (Figura 41, 43, 44), como ya se indicó en el Capítulo II. Tras tratamientos a 800MPa, a 20°C durante 30 min, se han observado desnaturalizaciones de, aproximadamente el 35% (Huppertz y col., 2004b, Anema y col. (2008a), similares a las obtenidas en nuestro estudio.

La solubilización de caseínas producida por la alta presión, junto con el hecho de que la desnaturalización de la  $\beta$ -Lg se produzca en mayor medida que la de la  $\alpha$ -La, hace posible seleccionar las condiciones que proporcionan sobrenadantes de ultracentrifugación de leche presurizada de vaca que simulen la composición de la leche de mujer. Como se muestra en la Tabla 14, presiones en torno a 450 o 550 MPa proporcionan, en los sobrenadantes de ultracentrifugación, relaciones de caseínas a proteínas de suero de, aproximadamente, 1.4-1.6, que se asemejan a la relación recomendada en las fórmulas infantiles de 1.5 (60:40 caseínas:seroproteínas). La relación en la leche de partida fue de 6.9, superior a la descrita normalmente para una leche de vaca (4), posiblemente porque, con nuestro método, sólo cuantificamos  $\beta$ -Lg y  $\alpha$ -La, con lo que no se tiene en cuenta la contribución de otras proteínas minoritarias del suero como la BSA, etc. Cabría esperar, entonces, que las relaciones fueran ligeramente superiores a las que se muestran en la Tabla 14. Por otra parte, el contenido en proteína soluble de los sobrenadantes de ultracentrifugación de las muestras empleadas en este estudio (comprendido entre el 1.05 y el 1.29 %. Tabla 12) también resultó similar al de la leche humana (aproximadamente 0.94% de media, Manso et al. 2007). Finalmente, debe tenerse en cuenta que la leche humana no contiene  $\beta$ -Lg, por lo que la  $\alpha$ -La supone aproximadamente el 30% del total de proteínas. Presiones  $\geq 700$  MPa desnaturalizan más  $\beta$ -Lg y aumentan la proporción de  $\alpha$ -La dentro del total de las proteínas de suero (Tabla x.3), pero también incrementan el contenido en caseína soluble sin reducir considerablemente el de  $\beta$ -Lg. Además, presiones en torno a 450 o 550 MPa mantendrían en mayor medida los niveles de proteínas minoritarias, Lf e IgA, nativas, respecto a presiones más elevadas.

Los efectos de la alta presión en estas proteínas minoritarias han sido bastante ignorados. El contenido de Lf en la leche bovina puede variar entre 0.02 y 0.2 mg/mL según el periodo de lactación (Steijns y Van Hooijdonk, 2000). El contenido en Lf determinado en la leche control antes del fraccionamiento fue de 0.14 mg/mL y disminuye al aumentar la presión hasta llegar a 0,00011 mg/mL a 900 MPa (Figura 45), debido probablemente a la desnaturalización de la Lf. Los niveles de Lf encontrados en la fracción soluble a pH 4.6 fueron similares a los de la leche antes de fraccionar (0.14 a 0.0026 mg/mL), pues la recuperación de Lf en suero de leche cruda sin calentar es prácticamente completa y sólo se reduce a medida que se incrementa la desnaturalización (Brisson y col., 2007). Sin embargo, el contenido fue considerablemente menor en el sobrenadante obtenido por ultracentrifugación (0.09 a 0.0015), probablemente debido a que una parte de la Lf

desnaturalizada pueda estar unida a fragmentos caseínicos no sedimentables (Figura 45). La Lf establece interacciones intermoleculares vía puentes disulfuro con las caseínas y otras proteínas séricas durante el calentamiento de la leche (Brisson y col., 2007) por lo que durante los tratamientos de alta presión también podrían formarse estas uniones.

Nuestros resultados indican que la IgA se desnaturaliza a presiones comprendidas entre 250-450 MPa (Figura 46) y su contenido va disminuyendo a medida que se incrementa el nivel de presión, hasta niveles muy bajos a presiones  $\geq 700$  MPa. En leche humana, también se ha observado la desnaturalización de la IgA a presiones  $\geq 400$  MPa, aumentando con la aplicación de presiones crecientes durante 5 min. Sin embargo, Viazis y col. (2007) observaron que la inmunoreactividad y la concentración de IgA en leche humana presurizada (400 MPa durante 30, 60, 90 y 120 min) fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) que en la misma leche pasteurizada.

#### **IV.5. Conclusiones**

El tratamiento de leche a presiones muy elevadas, en torno a 700-900 MPa, no disminuyó el tamaño micelar ni indujo mayor solubilización de caseínas respecto a tratamientos a presiones inferiores de 450-550 MPa. Sin embargo, estos tratamientos produjeron una severa desnaturalización de las proteínas del suero, sobre todo de la  $\beta$ -Lg y de las proteínas minoritarias, Lf e IgA, aunque también condujeron a una apreciable desnaturalización de la  $\alpha$ -La. Por ello, el mejor compromiso para producir fracciones proteicas con una concentración de proteína y una relación de caseínas a proteínas de suero similar a la de la leche humana, sería utilizar presiones de 450-550 MPa aplicadas durante 5 min. Estos tratamientos proporcionan, sobrenadantes de ultracentrifugación, con contenidos en proteína entre el 1.05 y el 1.29 % y relaciones de caseínas a proteínas de suero de, aproximadamente, 1.4-1.6, aunque contienen una apreciable proporción de  $\beta$ -Lg desnaturalizada soluble.



## **5. CONCLUSIONES**



1. Los tratamientos con alta presión a 650 MPa durante 5 min, aplicados a fórmulas infantiles, no producen isomerización de la lactosa, ni avance de la reacción de Maillard y, comparados con tratamientos UHT, conducen a una menor desnaturalización de las proteínas mayoritarias y minoritarias (lactoferrina e inmunoglobulina A secretora) del suero, por lo que mejoran la calidad nutritiva de las fórmulas.
2. La aplicación de tratamientos con alta presión en distintos equipos y a diferentes escalas, industrial y piloto, da lugar a diferentes distribuciones proteicas, sobre todo en lo que se refiere a la desintegración micelar. Los diferentes equipos proporcionan grados de desnaturalización de las proteínas de suero más homogéneos, a niveles de presión equivalentes.
3. La velocidad de despresurización juega un papel fundamental en la distribución de proteínas entre las fases soluble y coloidal de la leche presurizada, puesto que el contenido en caseína soluble aumenta significativamente durante la fase de despresurización respecto a la fase de mantenimiento de la presión. Cuanto más lenta es la velocidad de despresurización, mayor es el nivel de caseína soluble.
4. La desnaturalización de la  $\beta$ -Lg tiene lugar, mediante enlaces disulfuro, fundamentalmente durante la fase de mantenimiento de la presión, produciéndose muy poca desnaturalización durante la fase de despresurización. La mayoría de las proteínas de suero desnaturalizadas, unidas o no a las partículas de caseína no sedimentables, permanecen solubles al pH normal de la leche.
5. La presencia de caseína promueve la desnaturalización de las proteínas del suero, pero el grado de desnaturalización de las proteínas de suero no influye en la ruptura micelar y en la subsiguiente solubilización de caseínas que tiene lugar en la leche presurizada.
6. El tratamiento de leche a presiones muy elevadas, en torno a 700-900 MPa, no disminuye el tamaño micelar ni induce mayor solubilización de caseínas respecto a tratamientos a presiones inferiores de 450-550 MPa. Sin embargo, estos tratamientos producen una severa desnaturalización de las proteínas del suero, sobre todo de la  $\beta$ -Lg y de las proteínas minoritarias, Lf e IgA.

7. Presiones de 450-550 MPa aplicadas durante 5 min permiten producir fracciones proteicas con una concentración de proteína entre el 1.05 y el 1.29 % y una relación de caseínas a proteínas de suero de, aproximadamente, 1.4-1.6, similar a la de la leche humana, aunque contienen una apreciable proporción de  $\beta$ -Lg desnaturalizada soluble.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**



**Alexandrescu, A.T.**, Evans, P.A., Pitkeathly, M., Baum, J. y Dobson, C.M. (1993). Structure and dynamics of the acid-denatured molten globule state of  $\alpha$ -lactalbumin: A two-dimensional NMR study. *Biochemistry* (Easton) 32, 1707-1718.

**Ames, J. M.** (1990). Control of the Maillard reaction in food systems. *Trends in Food Science and Technology* 1, 150-154.

**Anema, S.G.** (2008a). Heat and/or high-pressure treatment of skim milk: changes to the casein micelle size, whey proteins and the acid gelation properties of the milk. *International Journal of Dairy Technology* 61, 245-252.

**Anema, S.G.** (2008b). Effect of milk solids concentration on whey protein denaturation, particle size changes and solubilization of casein in high-pressure treated skim milk. *International Dairy Journal* 18, 228-235.

**Anema, S.G.**, Lee, S.K., Schrader, K. y Buchheim, W. (1997). Effect of pH on the turbidity of pressure-treated calcium caseinate suspensions and skim milk. *Milchwissenschaft* 52, 141-146.

**Anema, S.G.**, Lowe, E.K. y Stockman, G. (2005a). Particle size changes and casein solubilisation in high-pressure-treated skim milk. *Food Hydrocolloids* 19, 257-267.

**Anema, S.G.**, Stockmann, R. y Lowe, E. K. (2005b). Denaturation of  $\beta$ -Lactoglobulin in pressure-treated skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 7783-7791.

**Arias, M.**, López-Fandiño, R. y Olano, A. (2000). Influence of pH on the effects of high pressure on milk proteins. *Milchwissenschaft* 55, 191-194.

**Bakker-Zierikzee, A.M.**, Van Tol, E.A.F, Kroes, H., Alles, M.S., Kok, F.J. y Bindels, J.G. (2006). Faecal sIgA secretion in infants fed on pre- or probiotic infant formula. *Pediatric Allergy and Immunology* 17, 134-140.

**Bakker-Zierikzee, A.M.**, van Tol, E.A.F., Kroes, H., Alles, M.S., Kok, F.J. y Bindels, J.G. (2006). Faecal sIgA secretion in infants fed on pre- or probiotic infant formula. *Pediatric Allergy and Immunology* 17, 134-140.

**Balasubramaniam, V.M.**, Farkas, D. y Turek, E. (2008). Preserving foods through high-pressure processing. *Food Technology* 62, 32-38.

**Balasubramaniam, V.M.**, Ting, E.Y., Steward, C.M. y Robbins, J.A. (2004). Recommended laboratory practices for conducting high pressure microbial inactivation experiments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 5, 299-306.

**Balasubramanian, S. y Balasubramaniam, V.M.** (2003). Compression heating influence of pressure transmitting fluid son bacteria inactivation during HP processing. *Food Research International* 36, 661-668.

**Balmer, S.E. y Wharton, B.A.** (1989). Diet and faecal flora in the newborn: breast milk and infant formula. *Archives of Disease in Childhood* 64, 1672-1677.

**Banon, S. y Hardy, J.** (1992). A colloidal approach of milk acidification by glucono-delta-lactone. *Journal of Dairy Science* 75, 935-94.

**Barbosa-Cánovas, G. y Bermúdez-Aguirre, D.** (2011). Introduction. En: *Nonthermal processing technologies for food*, Zhang, H. Q., Barbosa-Cánovas, G. V., Balasubramaniam, V. M., Dunne, C. P., Farkas, D. F. y Yuan, T. C. (Eds.). Wiley-Blackwell. Iowa, USA, pp. XX-XXX.

**Barbosa-Cánovas, G.V. y Bermúdez-Aguirre, D.** (2010). Novel food processing technologies and regulatory hurdles. En: *Ensuring global Food Safety: Exploring Global Harmonization*. Boisrobert, C., Stjepanovic, A., Oh, S. y Lelieveld, H. (Eds.). Elsevier Inc. London, UK, pp. 281-288.

**Barth, C.A. y Schlimme, E.** (1988). Milk proteins: nutritional, clinical, functional and technological aspects. Springer-Verlag, Nueva York.

**Belloque, J.**, López-Fandiño, R. y Smith, G.M. (2000). A <sup>1</sup>H-NMR study on the effect of high pressures on beta-lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3906-3912.

**Bermúdez-Aguirre, D. y Barbosa-Cánovas, G. V.** (2011). An update on high hydrostatic pressure, from the laboratory to industrial applications. *Food Engineering Reviews* 3, 44-61.

**Bertrand-Harb, C.**, Baday, A., Dalgalarondo, M., Chobert, J.M. y Haertlé, T. (2002). Thermal modifications of structure and co-denaturation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin induce changes of solubility and susceptibility to proteases. *Nahrung-Food* 46, 283-289.



**Bosch, L.,** Alegría, A., Farré, R. y Clemante, G. (2000). Effect of storage conditions on furosine formation in milk-cereal based baby foods. *Food Chemistry* 107, 1681-1686.

**Bravo, F.I.,** Villamiel, M. y Molina, E. (2007). Emulsifying properties of  $\alpha$ -lactalbumin after high-pressure treatment and subsequent lactosylation. *High Pressure Research* 27, 115-119.

**Brisson, G.,** Britten, M. y Pouliot, Y. (2007). Effect of iron saturation on the recovery of lactoferrin in rennet whey coming from heat-treated skim milk. *Journal of Dairy Science* 90, 2655-2664.

**Buzrul, S.,** Alpas, H., Largeteau, A., Bozoglu, F. y Demazeau, G. (2008). Compression heating of selected pressure transmitting fluids and liquids foods during high hydrostatic pressure treatment. *Journal of Food Engineering* 85, 466-472.

**Caessens, P.W.J.R.,** Visser, S. y Gruppen, H. (1997). Method for the isolation of bovine  $\beta$ -lactoglobulin from a cheese whey protein fraction and physicochemical characterization of the purified product. *International Dairy Journal* 7, 229-235.

**Capellas, M. y Needs, E.** (2003). Physical properties of yogurt prepared from pressure-treated concentrated or fortified milks. *Milchwissenschaft* 58, 46-48.

**Cayot, P. y Lorient, D.** (1997). Structure-function relationships of whey proteins. En: *Food Proteins and their Applications*. Damodaran, S. y Paraf, A. (Eds.). Marcel Dekker, Inc., pp. 225-256.

**Cheftel, J.C.** (1991). Application des hautes pressions en technologie alimentaire. *Actualités des Industries Alimentaires et Agro-Alimentaire* 108, 141-153.

**Chierici, R. y Vigi, V.** (1994). Lactoferrin in infant formula. *Acta Paediatrica* 83, 83-88.

**Considine, T.,** Patel, H.A., Anema, S.G., Singh, H. y Creamer, L.K. (2007). Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments- a review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8, 1-23.

**Corzo, N.,** Delgado, T., Troyano, E. y Olano A. (1994). Ratio of lactulose to furosine as indicator of quality of commercial milks. *Journal of Food Protection* 57, 737-739.

**Cullen, P.J.**, Tiwari, B.K. y Valdramidis, V.P. Status and trends of novel thermal and non-thermal technologies for fluids foods. En: *Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods*. Cullen, P. J., Tiwari, B. K. y Valdramidis, V. P. (Eds.). Elsevier, Inc. London, UK, pp. 1-6

**Daoudi, L.** (2004). Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre el gazpacho y zumo de uva. Universitat Autònoma de Barcelona. Tesis doctoral.

**De Kruif, C.G.** (2003). Caseins. En: *Progress in Biotechnology, volume 23*. W.Y. Aalbersberg, W. Y., Hamer, R. J., Jasperse, P., De Jongh, H. H. J., De Kruif, C. G., Walstra, P. y De Wolf, F. A. (Eds). Elsevier Science B.V, London, UK, pp. 219-269.

**Desobry-Banon, S.**, Richard, F. y Hardy, J. (1994). Study of acid and rennet coagulation of high pressurized milk. *Journal of Dairy Science* 77, 3267–3274.

**Drake, M.A.**, Harrison, S.L., Asplund, M., Barbosa-Cánovas, G. y Swanson, B.G. (1997). High pressure treatment of milk and effects on microbiological and sensory quality of Cheddar cheese. *Journal of Food Science* 62, 843–860.

**Dupont, D.**, Boutrou, R., Menard, O., Jardin, J., Tanguy, G., Schuck, P., Haab, B.B. y Leonil, J. (2010). Heat treatment of milk during powder manufacture increases casein resistance to simulated infant digestion. *Food Digestion* 1, 28-39.

**Erbersdobler, H.F. y Hupe, A.** (1991). Determination of lysine damage and calculation of lysine bioavailability in several processed foods. *Zeitschrift fur Ernährungswissenschaft* 30, 46-49.

**Famelart, M.H.**, Chapron, L., Piot, M., Brulé, G. y Durier, C. (1998). High pressure-induced gel formation of milk and whey concentrates. *Journal of Food Engineering* 36, 149–164.

**Ferragut, V.**, Martínez, V.M., Trujillo, A.J. y Guamis, B. (2000). Properties of yogurts made from whole ewe's milk treated by high hydrostatic pressure. *Milchwissenschaft* 55, 267–269.

**Ferrandini, E.**, Castillo, M., López, M.B. y Laencina, J. (2006). Modelos estructurales de la micela de caseína. *Anual. Veterinaria* 22, 5-18.

- Ferrer, E.,** Alegría, A., Farré, R., Abellán, P., Romero, F. y Clemente, G. (2003). Evolution of available lysine and furosine contents in milk-based infant formulas throughout the shelf-life storage period. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83, 465-472.
- Fertsch, B.,** Müller, M. y Hinrichs, J. (2003). Firmeness of pressure-induced casein and whey protein gels modulated by holding time and rate of pressure release. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 4, 143-150.
- Floris, R.,** Lambers, T., Alting, A. y Kiers, J. (2007). Trends in infant formulas: a dairy perspective. En: Improving the safety and quality of milk. Volume 2: improving quality in milk products. Griffiths, M.W. (ed). Woodhead, Cambridge, pp 454-474.
- Ford, J.E.,** Law, B.A., Marshall, V.M.E. y Reiter, B. (1977). Influence of heat treatment of human milk on some of its protective constituents. *Journal of Pediatrics* 90, 29-35.
- Fox, P.F. y Brodkorb, A.** (2008). The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal* 18, 677-684.
- Fox, P.F. y Kelly, A.L.** (2004). The caseins. En: *Proteins in Food Processing*. Yada, R.Y. (Eds.). Woodhead Publishing Limited. Cambridge, pp. 29-71.
- García-Risco, M.R.,** Olano, A., Ramos, M. y López-Fandiño, R. (2000). Micellar changes induced by high pressure. Influence in the proteolytic activity and organoleptic properties of milk. *Journal of Dairy Science* 83, 2184-2189.
- García-Risco, M.R.,** Recio, I., Molina, E. y López-Fandiño, R. (2003). Plasmin activity in pressurized milk. *Journal of Dairy Science* 86, 728-734.
- Gaucheron, F.,** Famelart, M.H., Mariette, F., Raulot, K., Michel, F. y Le Graet, Y. (1997). Combined effects of temperature and high-pressure treatments on physicochemical characteristics of skim milk. *Food Chemistry* 59, 439-447.
- Geghardt, R.,** Doster, W., Friedrich, J. y Kulozik, U. (2006). Size distribution of pressure-decomposed casein micelles studied by dynamic light scattering and AFM. *European Biophysics Journal* 35, 503-509.
- Ginger, M.R. y Grigor, M.R.** (1999). Comparative aspects of milk caseins. *Comparative Biochemistry Physiology B-Biochemistry & Molecular* 124, 133-145.

**Grinberg, V.Y. y Heartlé, T.** (2000). Reducer driven baric denaturation and oligomerisation of whey proteins. *The Journal of Biochemistry* 79, 205-209.

**Guerra-Hernández, E.,** León, C., Corzo, N., García-Villanova, B. y Romera, J.M. (2002). Chemical changes in powdered infant formulas during storage. *International Journal of Dairy Technology* 55, 171-176.

**Hambling, S.G.,** Mc Alpine, A.S. y Sawyer, L. (1992).  $\beta$ -Lactoglobulin. En: *Advanced Dairy Chemistry, volume 1: Proteins*. Fox, P.F. (Eds.), Elsevier Inc. London, pp. 141-190.

**Harte, F.,** Amonte, M., Luedecke, L., Swanson, B.G. y Barbosa-Cánovas, G.V. (2002). Yield-stress and microstructure of set yogurt made from high hydrostatic pressure-treated full fat milk. *Journal of Food Science* 67, 2245–2250.

**Heremans, K.** (1984). High-pressure effects on proteins and other biomolecules. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* 11, 1-21.

**Hinrichs, J. y Rademacher, B.** (2005). Kinetics of combined thermal and pressure-induced whey protein denaturation in bovine skim milk. *International Dairy Journal* 14, 315-323.

**Hinrichs, J. y Rademacher, B.** (2004). High pressure thermal denaturation kinetics of whey proteins. *Journal of Dairy Research* 71, 480-488.

**Hite, B.H.** (1899). The effects of pressure in the preservation of milk. *West Virginia Agricultural Experiment Station Bulletin* 58, 15-35.

**Hogan, E.,** Kelly, A.L. y Sun, D.W. (2005). High pressure processing of foods: an overview. En: *Emerging Technologies for Food Processing*. Sun, D.W. (Eds.). Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 3-32.

**Holt, C.** (1992). Structure and properties of bovine casein micelles. *Advances in Protein Chemistry* 43, 63-151.

**Holt, C.** (1994). The biological function of casein. En: *Yearbook 1994*. The Hannah Institute. Scotland, pp 60-68.

**Horne, D.S.** (1998). Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *International Dairy Journal* 8, 171-177.

**Hubbard, C.D.**, Caswell, D., Ludemann, H.D. y Arnold, M. (2002). Characterisation of pressure-treated skimmed milk powder dispersion: application of NMR spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 1107-1114.

**Huppertz, T. y De Kruif, C.G.** (2006). Disruption and reassociation of casein micelles under high pressure: influence of milk serum composition and casein micelle concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 5903-5909.

**Huppertz, T. y De Kruif, C.G.** (2007a). High pressure-induced solubilisation of micellar calcium phosphate from cross-linked casein micelles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 295, 264-268.

**Huppertz, T. y De Kruif, C.G.** (2007b). Disruption and reassociation of casein micelles during high pressure treatment: influence of whey proteins. *Journal of Dairy Research* 74, 194-197.

**Huppertz, T.**, Fox, P.F. y Kelly, A.L. (2004a). High pressure treatment of bovine milk: effects on casein micelles and whey proteins. *Journal of Dairy Research* 71, 97-106.

**Huppertz, T.**, Fox, P.F. y Kelly, A.L. (2004b). High pressure-induced denaturation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in bovine milk and whey: a possible mechanism. *Journal of Dairy Research* 71, 489-495.

**Huppertz, T.**, Fox, P.F. y Kelly, A.L. (2004c). Dissociation of caseins in high pressure-treated bovine milk. *International Dairy Journal* 14, 675-680.

**Huppertz, T.**, Fox, P.F. y Kelly, A.L. (2004d). Properties of casein micelles in high pressure-treated bovine milk. *Food Chemistry* 87, 103-110.

**Huppertz, T.**, Fox, P.F. y Kelly, A.L. (2004f). Effects of high pressure treatment on the yield of cheese curd from bovine milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 5, 1-8.

**Huppertz, T.**, Fox, P.F. y Kelly, A.L. (2004g). Influence of high pressure treatment on the acidification of bovine milk by lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft-Milk Science International* 59, 246-249.

**Huppertz, T.**, Fox, P.F., De Kruif, K.G. y Kelly, A.L. (2006a). High pressure-induced changes in bovine milk proteins: a review. *Biochimica et Biophysica Acta* 1764, 593-598.

**Huppertz, T.**, Grosman, S., Fox, P.F. y Kelly, A.L. (2004e). Heat and ethanol stabilities of high pressure-treated bovine milk. *International Dairy Journal* 14, 125-133.

**Huppertz, T.**, Kelly, A.L. y De Kruif, C.G. (2006b). Disruption and reassociation of casein micelles under high pressure. *Journal of Dairy Research* 73, 294-298.

**Huppertz, T.**, Kelly, A.L. y Fox, P.F. (2002). Effects of high pressure on constituents and properties of milk. *International Dairy Journal* 12, 561-572.

**Huppertz, T.**, Smiddy, M.A., Upadhyay, V.K. y Kelly, A.L. (2006c). High-pressure-induced changes in bovine milk: a review. *International Journal of Dairy Technology* 59, 58-66.

**Imafidon, G.I. y Farkye, N.Y.** (1996). Solvation of rennet curd from high-heat-treated milk influenced by acid type and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 2560-2562.

**Indyk, H.E. y Filonzi, E.L.** (2005). Determination of lactoferrin in bovine milk, colostrum and infant formulas by optical biosensor analysis. *International Dairy Journal* 15, 429-438.

**International Dairy Federation (1992).** Influence of technology on the quality of heat treated milk and fluid milk products. B-Doc. 222, IDF, Bruselas, Bélgica.

**Jenssen, H. y Hancock, R.E.W.** (2009). Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie* 91, 19-29.

**Johnston, D.E.**, Austin, B.A. y Murphy, R.J. (1992). Effects of high hydrostatic pressure on milk. *Milchwissenschaft* 47, 760-763.

**Johnston, D.E.**, Austin, B.A. y Murphy, R.J. (1993). Properties of acidset gels prepared from high pressure treated milk. *Milchwissenschaft* 48, 206-209.

**Johnston, D.E.**, Murphy, R.J., Rutherford, J.A. y McCreedy, R.W. (2002). Acidification of high pressure treated milk: The role of whey protein denaturation. *Milchwissenschaft* 57, 605-608.

**Keenan, R.D.**, Young, D.J., Tier, C.M., Jones, A. D. y Underdown, J. (2001). Mechanism of pressure-induced gelation of milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 3394-3402.

**Kelly, A.L. y Zeece, M.** (2009). Applications of novel technologies in processing of functional foods. *Australian Journal of Dairy Technology* 64, 12-15.

**Kelly, A.L.,** Huppertz, T. y Fox, P.F. (2002). Structural properties of casein micelles in high-pressure-treated milk. *Technical Program Abstract 197 IFT Annual Meeting*.

**Kilara, A.** (2004). Whey proteins. En: *Proteins in food processing*. Yada, R.Y. (Eds.). Woodhead Publishing Limited. Cambridge, pp. 72-99.

**Knoerzer, K.,** Buckow, R. y Versteeg, C. (2010b). Adiabatic compression heating coefficients for high-pressure processing- A study of some insulating polymer materials. *Journal of Food Engineering* 98, 110-119.

**Knoerzer, K.,** Buckow, R., Sanguansri, P. y Versteeg, C. (2010a). Adiabatic compression heating coefficients for high-pressure processing of water, propylene-glycol and mixtures- A combined experimental and numerical approach. *Journal of Food Engineering* 96, 229-238.

**Koletko B.,** von Kries, R., Closa, R., Escribano, J., Scagliolini et al. (2009). Can infant feeding choices modulate later obesity risk? *American Journal of Clinical Nutrition* 89, 1502S-158S.

**Law, A. J. R.,** Leaver, J., Felipe, X., Ferragut, V., Pla, R. y Guamis, B. (1998). Comparison of the effects of HP and thermal treatments on the casein micelles in goat's milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 2523-2530.

**Lönnerdal, B.** (2009). Nutritional roles of lactoferrin. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 12, 293-297.

**Lönnerdal, B.** (2010). Novel insights into human lactation as a driver of infant formula development. *Nestle Nutrition Workshop Series. Pediatric Program* 66, 19-29.

**López-Fandiño, R.** (2006a). High pressure-induced changes in milk proteins and possible applications in dairy technology. *International Dairy Journal* 16, 1119-1131.

**López-Fandiño, R.** (2006b). Functional improvement of milk whey proteins induced by high hydrostatic pressure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46, 351-363.

**López-Fandiño, R. y Olano, A.** (1998). Effects of high pressure combined with moderate temperatures on the rennet coagulation properties of milk. *International of Dairy Journal* 8, 623-627.

**López-Fandiño, R. y Olano, A.** (1999). Selected indicators of the quality of thermal processed milk. *Food Science And Technology International* 5, 121-137.

**López-Fandiño, R., Carrascosa, A.V. y Olano, A.** (1996). The effects of high pressure on whey protein denaturation and cheese-making properties of raw milk. *International Dairy Journal* 79, 929-936.

**López-Fandiño, R., De la Fuente, M.A., Ramos, M. y Olano, A.** (1998). Distribution of minerals and proteins between the soluble and colloidal phases of pressurized milks from different species. *Journal of Dairy Research* 65, 69-78.

**López-Fandiño, R., Ramos, M. y Olano, A.** (1997). Rennet coagulation of milk subjected to high pressures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 3233-3237.

**Lucey, J.A., Gorry, C., OKennedy, B., Kalab, M., Tankinita, R. y Fox, P.F.** (1996). Effect of acidification and neutralization of milk on some physico-chemical properties of casein micelles. *International Dairy Journal* 6, 257-272.

**Maede, S.J., Reid, E. A. y Gerrard, J.A.** (2005). The impact of processing on the nutritional quality of food proteins. *Journal of AOAC International* 88, 904-922.

**Manso, M., Miguel, M. y López-Fandiño, R.** (2007). Application of capillary zone electrophoresis to the characterisation of the human milk protein profile and its evolution throughout lactation. *Journal of Chromatography A* 1146, 110-117.

**Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I. y Hernández-Ledesma, B.** (2012). Antihypertensive peptides from food proteins: a review. *Food & Function* 3, 350-361.

**Masson, P.** (1992). Pressure denaturation of proteins. En: *Pressure and biotechnology*. Balny, B., Hayashi, R. y Heremans, K. (Eds.). Libby Eurotext Ltd. Montrouge, France, pp. 89-99

**Merel-Rausch, E., Duma, I. P. y Hinrichs, J.** (2006). Pressure-induced modification of casein micelles- Influence of pressure built-up rate, pressure level, release rate and temperature on viscosity and particle size. *Milchwissenschaft* 61, 255-259.



- Merel-Rausch, E.,** Kulozik, U. y Hinrichs, J. (2007). Influence of pressure release rate and protein concentration on the formation of pressure-induced casein structures. *Journal of Dairy Research* 74, 283-289.
- Mertens, B. y Deplace, G.** (1993). Engineering aspects of high-pressure technology in the food industry. *Food Technology* 47, 164-169.
- Molina, E.,** Álvarez, M.D., Ramos, M., Olano, A. y López-Fandiño, R. (2000). Use of high-pressure treated milk for the production of reduced-fat cheese. *International Dairy Journal* 10, 467-475.
- Monahan, F.J.,** McClemants, D.J. y Kinsella, J.E. (1993). Polymerization of whey proteins in whey protein-stabilized emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, 1826-1829.
- Montilla, T.,** Moreno, F. J. y Olano, A. (2005). A reliable gas capillary chromatographic determination of lactulose in dairy samples. *Chromatographia* 62, 311-314.
- Morales, V.,** Olano, A. y Corzo, N. (2004). Ratio maltose to maltulose and furosine as quality parameters for infant formula. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 6732-6736.
- Morr, C.V.** (1967). Effect of oxalate and urea on the ultra-centrifugation properties of raw and heated skim milk casein micelles. *Journal of Dairy Science* 50, 1744-1751.
- Mozhaev, V.V.,** Heremans, K., Frank, J., Masson, P. y Balny, C. (1996). High pressure effects on protein structure and function. *Proteins-Structure Function and Genetics* 24, 81-91.
- Mozhaev, V.V.,** Heremans, K., Frank, J., Masson, P. y Balny, C. (1994). Exploiting the effects of high hydrostatic-pressure in biotechnological applications. *Trends in Biotechnology* 12, 493-501.
- Mulsow, B. B.,** Jacob, M. y Henle, T. (2009). Studies on the impact of glycation on the denaturation of whey proteins. *European Food Research and Technology* 228, 643-649.
- Nabhan, M.A.,** Girardet, J.M., Campagna, S., Gaillard, J.L. y Le Roux, Y. (2004). Isolation and characterization of copolymers of  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin,  $\kappa$ -casein, and  $\alpha_{s1}$ -casein generated by pressurization and thermal treatment of raw milk. *Journal of Dairy Science* 87, 3614-3622.

**Nasirpour, A.**, Scher, J. y Desobry, S. (2006). Baby foods: formulations and interactions (a review). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46, 665-681.

**Needs, E.C.**, Capellas, M., Bland, A.P., Manoj, P., MacDougal, D. y Paul, G. (2000a). Comparison of heat and pressure treatments of skimmed milk, fortified with whey concentrate, for set yogurt preparation: effects on milk proteins and gel structure. *Journal of Dairy Research* 67, 329-348.

**Needs, E.C.**, Stenning, R.A., Gill, A.L., Ferragut, V. y Rich, G.T. (2000b). High-pressure treatment of milk: effects on casein micelle structure and on enzymatic coagulation. *Journal of Dairy Research* 67, 31-42.

**Nguyen, L. T. y Balasubramaniam, V. M.** (2011). Fundamentals of food processing using high pressure. En: *Nonthermal processing technologies for food*. Zhang, H. Q., Barbosa-Cánovas, G. V., Balasubramaniam, V. M., Dunne, C. P., Farkas, D. F. y Yuan, T. C. (Eds). Wiley-Blackwell. Iowa, USA, pp. 3-19.

**Norton, T. y Sun, D. W.** (2008). Recent advantages in the use of HP as an effective processing technique in the food industry. *Food and Bioprocess Technology* 1, 2-34.

**Okpala, C.O.R.**, Piggott, J.R. y Schaschke, C.J. (2010). Influence of high-pressure processing (HPP) on physico-chemical properties of fresh cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11, 61-67.

**Orlien, V.**, Boserup, L. y Olsen, K. (2010). Casein micelle dissociation in skim milk during high-pressure treatment: effects of pressure, pH and temperature. *Journal of Dairy Science* 93, 12-18.

**Orlien, V.**, Knudsen, J.C., Colon, M. y Skibsted, L.H. (2006). Dynamics of casein micelles in skim milk during and after high pressure treatment. *Food Chemistry* 98, 513-521.

**Orlien, V.**, Olsen, K. y Skibsted, L.H. (2007). In situ measurements of pH changes in  $\beta$ -lactoglobulin solutions under high hydrostatic pressure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 4422-4428.

**Panick, G.**, Melessa, R. y Winter, R. (1999). Differences between the pressure- and temperature-induced denaturation and aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin A, B and AB monitored by FTIR spectroscopy and small-angle X-ray scattering. *Biochemistry* 38, 6512-6519.

**Patel, H. A.**, Singh, H., Anema, S. G. y Creamer, L. K. (2006). Effect of heat and high pressure hydrostatic pressure treatments on disulfide bonding interchanges among the proteins in skim milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3409-3420.

**Patel, H.A.**, Sigh, H., Havea, P., Considine, T. y Creamer, L.K. (2005). Pressure-induced unfolding and aggregation of the proteins in whey protein concentrate solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 9590-9601.

**Paulsson, M. A.**, Svensson, U., Kishore, A. R. y Naidu, A. S. (1993). Thermal-behaviour of bovine lactoferrin in water and its relation to bacterial interaction and antibacterial activity. *Journal of Dairy Science* 76, 3711-3720.

**Pereyra-González, A. S.**, Naranjo, G. B., Malec, L. S. y Vigo, M. S. (2003). Available lysine, protein digestibility and lactulose in commercial infant formulas. *International Dairy Journal* 13, 95-99.

**Pischetsrieder, M. y Henle, T.** (2012). Glycation products in infant formulas: chemical, analytical and physiological aspects. *Amino Acids* 42, 1111-1118.

**Raventós, M.** (2005). Tratamientos por altas presiones en la conservación y transformación de alimentos. En: *Industria alimentaria. Tecnologías emergentes*. Edicions de la Universitat Politècnica de Catalunya. Barcelona, Spain, pp. 25-76.

**Recio, I.**, Amigo, L., Ramos, M. y López-Fandiño, R. (1997). Application of capillary electrophoresis to the study of proteolysis of caseins. *Journal of Dairy Research* 64, 221-230.

**Recio, I.**, Ramos, M. y López-Fandiño, R. (2001). Capillary electrophoresis for the analysis of food proteins of animal origin. *Electrophoresis* 22, 1489-1502.

**Regnard, P.** (1884). Effet des hautes pressions sur les animaux marins. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales* 36, 394-395.

**Regnault, S.**, Thiebaud, M., Dumay, E. y Cheftel, J.C. (2004). Pressurization of raw skim milk and of a dispersion of phosphocaseinate at 9 °C or 20 °C: effects on casein micelle size distribution. *International Dairy Journal* 14, 55-68.

**Resmini, P.**, Pellegrino, L. y Batelli, G. (1990). Accurate quantification of furosine in milk and dairy products by a direct HPLC method. *Italian Journal of Food Science* 2, 173–183.

**Riel, R.** (1991). Composición y estructura físico-química de la leche. En: *Ciencia y tecnología de la leche*. Amiot, J. (Eds.) Acribia. Zaragoza, Spain, pp. 1-53.

**Riordan, J.** (1998). The biologic specificity of breastmilk. En: Breastfeeding and human lactation. 2ªed. Riordan, J. y Auerbach, K. G. (Eds). Boston, Jones and Barlett Publisher. pp. 121-161.

**Sakurai, K. y Goto, Y.** (2007). Principal component analysis of the pH-dependent conformational transitions of bovine  $\beta$ -lactoglobulin monitored by heteronuclear NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 15346-15351.

**Sandra, S.**, Stanford, M.A. y Meunier Goddik, L. (2004). The use of high pressure processing in the production of Queso Fresco cheese. *Journal of Food Science* 69, FEP153–FEP158.

**Sarriá, B.**, López-Fandiño, R. y Vaquero, M.P. (2001). Does processing of a powder or in-bottle-sterilized liquid infant formula affect calcium bioavailability? *Nutrition* 17, 326-331.

**Scheedhara, A.**, Flengsrud, R., Langsrud, T., Kaul, P., Prakash, V. y Vegarud, G. E. (2010). Structural characteristic, pH and thermal stabilities of apo and holo forms of caprine and bovine lactoferrins. *Biometals* 23, 1159-1170.

**Schlimme, E. y Buchheim, W.** (2002). Proteínas lácteas: caseínas, proteínas del suero y proteínas minoritarias. En: *La leche y sus componentes. Propiedades químicas y físicas*. Acribia. Zaragoza, Spain, pp. 33-75.

**Schmidt, D.G.** (1982). Association of caseins and casein micelle structure. En: *Developments in Dairy Chemistry, volume 1: Proteins*. Fox, P.F. (Eds). Applied Science Publishers. London, UK, pp. 63-110.

**Schrader, K. y Buchheim, W.** (1998). High pressure effects on the colloidal calcium phosphate and the structural integrity of micellar casein in milk II. Kinetics of the casein micelle disintegration and protein interactions in milk. *Kieler Milchwirtschaft- lithe Forschungsber* 50, 79-88.

**Schrader, K., Buchheim, W. y Morr, C.V.** (1997). High pressure effects on the colloidal calcium phosphate and the structural integrity of micellar calcium. Part 1. High pressure dissolution of colloidal calcium phosphate in heated milk systems. *Nahrung* 41, S133-S138.

**Schwarcz, W., Carnelocce, L., Silva, J., Oliveira, A. C. y Goncalves, R. B.** (2008). Conformational changes in bovine lactoferrin induced by slow or fast temperature increases. *Biological Chemistry* 389, 1137-1142.

**Schwertfeger, M. y Buchheim, W.** (1999). Coagulation of skim milk under high hydrostatic pressure with acidification by glucono-dlactone. *International Dairy Journal* 9, 487-492.

**Scollard, P.G., Beresford, T.P., Murphy, P.M. y Kelly, A.L.** (2000). Plasmin activity,  $\beta$ -lactoglobulin denaturation and proteolysis in high pressure treated milk. *International Dairy Journal* 10, 835-841.

**Silva, J.L. y Weber, G.** (1993). Pressure stability of proteins. *Annual Review of Physical Chemistry* 44, 89-113.

**Slattery, C.W.** (1976). Casein micelle structure; an examination of models. *Journal of Dairy Science* 59, 1547-1556.

**Smith, M. y McMahon, D.J.** (1996). Aseptic rennet coagulation of ultrahigh temperature processed milk concentrates. *Journal of Food Science* 79, 1513-1520.

**Steijns, J.M. y van Hooijdonk, A.C.M.** (2000). Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *British Journal of Nutrition* 84, S11-S17.

**Tanaka, N. y Kunugi, S.** (1996). Effect of pressure on the denaturation exchange reaction of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. *International Journal of Biological Macromolecules* 18, 33-39.

**Thompson, D. K. y Kharb, S.** (2007). Aspects of infant food formulation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 6, 79-102.

**Ting, E.** (2011). High-pressure processing equipment fundamentals. En: *Nonthermal processing technologies for food*. Zhang, H. Q., Barbosa-Cánovas, G. V., Balasubramaniam, V. M., Dunne, C. P., Farkas, D. F. y Yuan, T. C. (Eds.). Wiley-Blackwell. Iowa, USA, pp. 20-27

**Ting, E.Y. y Marshall, R.G.** (2002). Production issues related to UHP food. En: *Engineering and food for the 21<sup>st</sup> century*. Welte-Chanes, J., Barbosa-Canovas, G.V. y Aguilera, J.M. (Eds.). CRC Press, Boca Raton, pp 727-738.

**Tomita, M., Wakabayashi, H., Shin, K., Yamauchi, K., Yaeshima, T. y Iwatsuki, K.** (2009). Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. *Biochimie* 91, 52-57.

**Tonello, C. (2011).** Case studies on high-pressure processing of foods. En: *Nonthermal processing technologies for food*, Zhang, H. Q., Barbosa-Cánovas, G. V., Balasubramaniam, V. M., Dunne, C. P., Farkas, D. F. y Yuan, T. C. (Eds.). Wiley-Blackwell. Iowa, USA, pp. 36-50.

**Viazis, S., Farkas, B.E. y Allen, J.C.** (2007). Effects of high-pressure processing on immunoglobulin A and lysozyme activity in human milk. *Journal of Human Lactation* 23, 253-261.

**Visser, H.** (1992). A new casein micelle model and its consequences for pH and temperature effects on the properties of milk. En: *Protein interactions*. Visser, H. (Eds.). VCH, Weinheim, Germany, pp 135-165.

**Walstra, P.** (1999). Casein sub-micelles: do they exist?. *International Dairy Journal* 9, 189-192.

**Walstra, P. y Jenness, R.** (1984). *Dairy Chemistry and Physics*. John Wiley and Sons, New York, USA.

**Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellma, A. y van Boekel, M.** (1999). *Dairy technology: Principles of milk properties and processes*. Marcel Dekker Inc. New York, USA.

**Waugh, D.F.** (1971). Formation and structure of casein micelles. En: Milk proteins: Chemistry and molecular biology. Volume 2. McKenzie, H.A. (Eds). Academic Press, New York, pp 3-85.

**Ye, A.,** Anema, S.G. y Singh, H. (2004). High-pressure-induced interactions between milk fat globule membrane proteins and skim milk proteins in whole milk. *Journal of Dairy Science* 87, 4013-4022.

**Zhai, J.,** Miles, A.J., Pattenden, L.K., Lee, T.H., Augustin, M.A., Wallace, B.A., Marie-Isabel Aguilar, M.I. y Wooster, T.J. (2010). Changes in  $\beta$ -lactoglobulin conformation at the oil/water interface of emulsions studied by synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy. *Biomacromolecules* 11, 2136-2142.

**Zhou, G.H.,** Xu, X.L. y Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat- A review. *Meat Science* 86, 119-128.

**Zobrist, M.R.,** Huppertz, T, Uniacke, T., Fox, P.F y Kelly, A.L. (2005). High pressure – induced changes in rennet-coagulation properties of bovine milk. *International Dairy Journal* 15, 655-662.